



## **II MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Instituto de Higiene e Medicina Tropical  
**Universidade Nova de Lisboa**



# **Identificação Molecular de Candidoses invasivas no Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E**

Métodos Convencionais vs. Métodos Moleculares

**Ana Paula Vicente Pereira**

**2010**





## **II MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Instituto de Higiene e Medicina Tropical  
Universidade Nova de Lisboa



# **Identificação Molecular de Candidoses invasivas no Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E**

Métodos Convencionais vs. Métodos Moleculares

**Ana Paula Vicente Pereira**

*Tese apresentada para obtenção do grau  
de Mestre em Ciências Biomédicas*

*Orientadora: Investigadora Doutora Maria da Luz Martins*

**2010**

## Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos aqueles que participaram directa ou indirectamente e que estiveram ao meu lado durante a realização deste trabalho. A todos eles deixo aqui o meu sincero agradecimento.

À **Doutora Maria da Luz Martins**, minha orientadora a quem quero, em primeiro lugar, deixar uma palavra de especial agradecimento, pela prova de interesse que dedicou a este projecto e pelo empenhamento e disponibilidade com que acompanhou a elaboração desta dissertação.

À Directora do Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira, **Dr.<sup>a</sup> Conceição Faria**, por ter autorizado a realização deste trabalho no serviço.

Às colegas da secção de Microbiologia, em especial à **Ana Rebelo** e à **Catarina Fonseca** pela compreensão e amizade e pela cedência de amostras clínicas.

Quero agradecer a todos os meus **colegas do laboratório** por todo o carinho, compreensão e ajuda disponibilizada.

Aos meus **amigos**, pelo carinho e incentivo e por toda a ajuda prestada durante a realização deste trabalho.

Aos *meus pais*, sem eles nada disto seria possível. Mesmo nas situações mais complicadas o seu apoio foi muito importante para que conseguisse concluir o objectivo a que me propus.

Ao meu *irmão Rui*, por todas as vezes que me abrigou e que foi a minha companhia em Lisboa no decorrer deste trabalho.

Ao *Pedro*, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida, pelo seu apoio incondicional, pela sua companhia e por todos os incentivos.

Muito obrigado a todos.

# ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO</b>	1
As leveduras patogénicas do género <i>Candida</i>	2
Factores que favorecem as infecções em meio hospitalar	6
Factores de virulência das espécies do género <i>Candida</i>	7
As infecções por <i>Candida sp.</i>	8
Diagnóstico convencional das infecções fúngicas	10
Diagnóstico molecular em Micologia Médica	15
RFLP (( <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> ))	16
Estudo da susceptibilidade aos Antifúngicos	18
Os agentes antifúngicos	19
Anfotericina B	20
Fluconazol	21
Voriconazol	21
Determinação da susceptibilidade aos antifúngicos	22
Resistência aos antifúngicos	24
O Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E.	25
Objectivos do Trabalho e Planos de Dissertação	28
 <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	 30
1. ORIGEM DAS ESTIRPES ESTUDADAS	31
2. MÉTODOS CONVENCIONAIS DE IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS	33
ISOLADAS DE INFECÇÕES	33
2.1. Isolamento, Identificação e Manutenção dos Isolados	33
2.2. Caracterização morfológica das leveduras	34
2.3. Identificação de <i>C. albicans</i>	34
2.4. Caracterização Fisiológica e Bioquímica	36
2.4.1. VITEK® (BioMérieux)	36
Preparação das amostras	37

Preparação do inóculo .....	37
Inoculação da carta de identificação .....	38
Leitura/Incubação de resultados .....	38
3. CANDIFAST .....	38
3.1. Preparação do Inóculo .....	40
3.2. Inoculação das galerias CANDIFAST .....	41
3.2.1. Teste de identificação .....	41
3.2.2. Teste de resistência .....	41
3.3. Leitura e interpretação das galerias .....	41
3.4. Série de identificação .....	41
3.5. Série para o teste de resistência .....	42
4. ESTUDO DA SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS PELO MÉTODO DE KIRBY-BAUER .....	43
4.1. O Método de difusão em disco .....	43
4.1.1. Preparação do meio de cultura .....	43
4.1.2. Preparação do Inóculo .....	43
4.1.3. Inoculação das placas .....	43
4.1.4. Aplicação dos discos de antifúngico .....	44
4.1.5. Leitura das placas .....	44
4.1.6. Interpretação dos resultados .....	44
5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS POR RFLP DA REGIÃO ITS DO rDNA .....	46
5.1. Isolados Estudados .....	46
5.2. Extração de DNA de fungos leveduriformes pelo método das microesferas .....	46
5.3. Preparação do DNA para PCR .....	47
5.4. Amplificação da região ITS do rDNA .....	47
5.5. Detecção dos produtos amplificados .....	49
6. RFLP DA REGIÃO ITS DO rDNA .....	50

6.1 Detecção dos fragmentos de restrição .....	52
PREVENÇÃO DE CONTAMINAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	54
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	55
ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Candida</i> sp. DO CENTRO HOSPITALAR COVA DA BEIRA, E.P.E. ....	56
Meio cromogénico CHROMagar <i>Candida</i> ® .....	64
Teste da blastese .....	65
CANDIFAST .....	66
Teste de Suscetibilidade aos Antifúngicos .....	70
Métodos moleculares para o diagnóstico e identificação de leveduras do género <i>Candida</i> .....	73
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	78
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	85
ANEXO I .....	103
ANEXO II .....	109
ANEXO III .....	115
ANEXO IV .....	121
ANEXO V .....	127



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Representação da formação de tubo germinativo de <i>Candida albicans</i> na prova de filamentação. ....	13
Figura 2	Esquema representativo da organização dos genes ribossómicos e dos primers universais e específicos mais utilizados na identificação de leveduras do género <i>Candida</i> . ....	18
Figura 3	Cartas de identificação de leveduras patogénicas do sistema automatizado VITEK® (BioMerieux). ....	37
Figura 4	Representação das galerias de identificação CANDIFAST®. ....	39
Figura 5	Representação do aspecto e da cor característica das colónias de cada espécie, identificadas pelo meio cromogénio CHROMagar <i>Candida</i> ®. ...	64
Figura 6	Painel CANDIFAST de identificação de leveduras. ....	67
Figura 7	Painel CANDIFAST de determinação de resistência das leveduras. ....	67
Figura 8	Padrões electroforéticos obtidos após amplificação por PCR da região ITS do rDNA de 6 espécies do género <i>Candida</i> : <i>C. albicans</i> (posição 2 e 3), <i>C. parapsilosis</i> (posição 4 e 5), <i>C. krusei</i> (posição 6 e 7), <i>C. glabrata</i> (posição 8 e 9), <i>C. lusitaniae</i> (posição 10 e 11) e <i>C. tropicalis</i> (posição 12 e 13). ...	74
Figura 9	Produtos de PCR de 6 espécies do género <i>Candida</i> após restrição com enzima <i>MspI</i> : <i>C. albicans</i> (posição 2), <i>C. parapsilosis</i> (posição 3), <i>C. lusitaniae</i> (posição 4), <i>C. krusei</i> (posição 5), <i>C. glabrata</i> (posição 6) e <i>C. tropicalis</i> (posição 7). ....	75

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Número de amostras clínicas estudadas em relação ao sexo dos doentes.	31
Tabela 2	Número de amostras clínicas estudadas em relação aos serviços clínicos do Centro Hospitalar da Cova da Beira, E.P.E. que as enviaram para diagnóstico laboratorial. ....	32
Tabela 3	Número de isolados obtidos a partir das diferentes amostras clínicas enviadas para diagnóstico laboratorial. ....	32
Tabela 4	Cor desenvolvida pelas leveduras do género <i>Candida</i> crescidas no meio CHROMagar <i>Candida</i> . <sup>®</sup> ....	34
Tabela 5	Representação dos açúcares e dos antifúngicos utilizados em cada teste.	40
Tabela 6	Identificação das espécies de leveduras do género <i>Candida</i> através das galerias CANDIFAST. ....	42
Tabela 7	Crítérios de interpretação dos halos de inibição e concentrações mínimas inibitórias (CMI) para o fluconazol e voriconazol. ....	45
Tabela 8	Sequência oligonucleotídica dos <i>primers</i> ITS1 e ITS4. ....	47
Tabela 9	Mistura reaccional usada nas reacções de PCR para amplificação da região ITS do DNA ribossómico de isolados clínicos do género <i>Candida</i> ....	48
Tabela 10	Programa de PCR utilizado na amplificação da região ITS do rDNA dos isolados clínicos de leveduras do género <i>Candida</i> . ....	49
Tabela 11	Composição do gel de agarose para visualização dos produtos de amplificação da região ITS dos isolados clínicos de leveduras do género <i>Candida</i> . ....	49
Tabela 12	Sequência de corte identificada pela enzima de restrição <i>MspI</i> e região de corte (seta a vermelho). ....	51
Tabela 13	Mistura reaccional usada em cada reacção de restrição com a enzima <i>MspI</i> para a identificação de isolados clínicos do género <i>Candida</i> . ..	51
Tabela 14	Composição do gel de agarose para visualização dos produtos de restrição com a enzima <i>MspI</i> para a identificação de isolados clínicos...	52

Tabela 15	Percentagem de isolados de cada espécie. ....	56
Tabela 16	Número de isolados de cada espécie, consoante o sexo. ....	59
Tabela 17	Número de isolados de cada espécie, consoante o Serviço hospitalar. ...	60
Tabela 18	Número de isolados em cada espécie obtidos a partir de diferentes amostras clínicas. ....	62
Tabela 19	Representação dos resultados de identificação de leveduras obtidos no teste CANDIFAST. ....	68
Tabela 20	Representação dos resultados de resistência de leveduras obtidos no teste CANDIFAST. ....	68
Tabela 21	Percentagem de isolados sensíveis e resistentes ao Fluconazol, para cada espécie. ....	70
Tabela 22	Percentagem de isolados sensíveis e resistentes ao Voriconazol, para cada espécie. ....	71
Tabela 23	Tamanhos das bandas da região ITS do DNA ribossómico de diferentes espécies do género <i>Candida</i> e tamanho das bandas após restrição com enzima <i>MspI</i> . ....	74
Tabela 24	Identificação convencional das leveduras isoladas no Centro Hospitalar da Cova da Beira E.P.E. a partir de doentes com infecção fúngica. ...	104
Tabela 25	Resultados do estudo da sensibilidade aos antifúngicos Fluconazol e Voriconazol pelo método de difusão em disco das leveduras do Centro Hospitalar da Cova da Beira E.P.E. incluídas neste trabalho. ....	110
Tabela 26	Resultados da identificação convencional e molecular dos isolados de leveduras do género <i>Candida</i> incluídas neste trabalho, isoladas no Centro Hospitalar da Cova da Beira E.P.E. ....	116
Tabela 27	Identificação dos diferentes produtos biológicos de acordo com o sexo, idade, serviço clínico do Centro Hospitalar da Cova da Beira E.P.E. que solicitou o diagnóstico laboratorial e enviou as amostras biológicas para análise e identificação do isolado. ....	112

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Percentagem de isolados de cada espécie. ....	56
Gráfico 2	Espécies de leveduras isoladas na população feminina. ....	59
Gráfico 3	Espécies de leveduras isoladas na população masculina. ....	59
Gráfico 4	Isolados de cada espécie referentes a cada Serviço hospitalar. ....	60
Gráfico 5	Número de isolados de cada espécie referentes a cada tipo de amostra clínica. ....	62

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CHCB	Centro Hospitalar Cova da Beira
CDC	Center for Disease Control
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido-trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer Regions</i>
KOH	Hidróxido de Potássio
NaCl	Cloreto de Sódio
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	Potato Dextrose Agar
R	Resistente
RNA	Ácido Ribonucleico
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
S	Sensível
SDD	Sensível Dependente da Dose
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
sp.	Espécie
TBE	Tampão Tris, Ácido Bórico e EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	Luz Ultravioleta
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana

## Resumo

As leveduras são fungos oportunistas responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas nos seres humanos. Este tipo de infecções é mais comum em indivíduos com o sistema imunitário comprometido e têm vindo a aumentar ao longo dos anos. A espécie *Candida albicans* é a mais frequentemente identificada, como sendo responsável por este tipo de infecções, no entanto, o número de infecções provocadas por outras espécies do género *Candida* ocorre cada vez com mais frequência.

As infecções hospitalares fúngicas constituem uma causa crescente de morbilidade e mortalidade em hospitais, afectando tanto doentes internados, como profissionais de saúde. Do ponto de vista etiológico, a grande maioria das infecções fúngicas hospitalares é causada por espécies do género *Candida*, principalmente *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. A sua identificação taxonómica, geralmente exige o seu isolamento inicial em meios de cultura, a realização de provas bioquímicas de assimilação *in vitro*, com a utilização de “kits” comerciais, ou a sua repicagem para meios cromogénios.

O principal objectivo deste trabalho foi a identificação rápida e eficaz de candidoses invasivas através de uma metodologia molecular de diagnóstico que fosse simples e fácil de implementar em laboratórios de diagnóstico microbiológico. Para tal, foram seleccionados 100 isolados clínicos de leveduras obtidas a partir de amostras clínicas enviadas para o Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira E.P.E. para o diagnóstico laboratorial de infecção fúngica durante um período de 8 meses, desde Novembro de 2008 até Junho de 2009.

O trabalho baseou-se na identificação molecular por PCR-RFLP de espécies do género *Candida*, e os resultados foram comparados com os obtidos pelos métodos de diagnóstico tradicionais (CHROMagar® *Candida* e VITEK® - bioMérieux) utilizados no laboratório hospitalar.

Foi ainda efectuado o estudo da sensibilidade *in vitro* de espécies do género *Candida* aos antifúngicos fluconazol, voriconazol, através dos métodos, de difusão em disco e E-Test®, segundo os procedimentos padronizados e publicados pelo CLSI, tendo-se verificado elevada sensibilidade dos isolados para ambos os fármacos.

Com este trabalho concluiu-se que a eficiente e rápida identificação dos fungos clinicamente relevantes por parte dos laboratórios de patologia clínica deve ser uma tarefa fundamental para o controle das infecções. A identificação ao nível da espécie é importante para determinar a etiologia da infecção, para detectar novos agentes da doença, para prever resistências intrínsecas a agentes antifúngicos e para detectar causas de infecções nosocomiais. Face ao exposto, os estudos epidemiológicos são de extrema importância, assim como o diagnóstico das infecções fúngicas.

O diagnóstico das infecções fúngicas continua a ser efectuado por métodos tradicionais, que avaliam características fisiológicas e bioquímicas dos elementos fúngicos, mas que apesar de serem eficazes são, na sua maioria, demoradas impedindo um início rápido e atempado da terapêutica. Como tal, os métodos moleculares podem constituir uma alternativa mais viável ao diagnóstico micológico, nomeadamente de leveduras do género *Candida*, como se pode comprovar pelos resultados obtidos neste trabalho.

## Abstract

Yeasts are fungi responsible for the major part of fungal infections that affect human beings. This type of infection is common in individuals with compromised immune system and has increased in number along the years. *Candida albicans* is the most frequently identified species responsible for this type of infection. However, the number of infections caused by other *Candida* species occurs every-time more frequently.

Nosocomial fungi-related infections are one growing cause of morbidity and death in hospital settings, and they commonly affect both patients and health professionals. From the etiologic point of view, the big majority of fungi-related nosocomial infections are also caused by species of *Candida*, mainly *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Taxonomical identification usually implies their initial isolation in culture media followed by submission to *in vitro* assimilation biochemical techniques (using commercial kits) or growth in chromogenic media.

The major goal underlying this work was the molecular identification of invasive candidoses through fast but yet powerful molecular diagnostic techniques. The chosen technique should be easy to implement in medical microbiology laboratories. We randomly selected 100 yeast infected samples previously submitted to the Clinical Pathology laboratory at the “Centro Hospitalar Cova da Beira E.P.E” for diagnosis. The samples were collected along the time during a span of 8 months (from November 2008 to July 2009).

Our work was based on the molecular identification of species of *Candida* species via PCR followed by RFLP analysis and comparison of our results to those from conventional methodologies used for diagnosis (CHROMagar® *Candida* and VITEK® - bioMérieux).



We have also performed an *in vitro* sensitivity assay of species of *Candida* towards Fluconazol and Voriconazol, two commonly used antifungal drugs. This study was performed using the standard methodologies (disk-diffusion and E-Test<sup>®</sup>) as published by the CLSI. Finally we verified high sensitivity of all samples towards both drugs.

We concluded that rapid but reliable identification of clinically-significant fungi is a fundamental task for clinical pathology laboratories. Identification to the species level it is important for: a) the etiological determination of the disease, b) to detect new disease-causing agents, c) to predict intrinsic resistance towards antifungal drugs, d) to determine the cause of nosocomial infections. Based on all the above we can say that the epidemiological studies and the diagnosis of fungal infections are of extreme importance.

Currently, diagnosis is performed using conventional methods that evaluate the biochemical and physiological characteristics of fungi-derived elements. These methodologies are very efficient for their identification purpose but generally slow, delaying the start of therapeutics.

As demonstrated by our results, molecular-based methodologies constitute an alternative for the fast but sensitive diagnostics of infections caused by yeast, mainly by *Candida* species.



## **As leveduras patogénicas do género *Candida***

As leveduras são fungos oportunistas responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas nos seres humanos. Nas últimas décadas, a incidência de infecções causadas por leveduras sofreu um grande aumento, nomeadamente em doentes com o sistema imunitário comprometido, como o caso de doentes transplantados e indivíduos infectados pelo HIV/SIDA. Nestes, o equilíbrio da interacção agente-hospedeiro é alterado, levando a uma expressão patogénica do fungo (Chang *et al.* 2003, Kuhn *et al.* 2003, Selitrennikoff *et al.* 2001).

Embora os avanços da medicina tenham vindo a permitir que doentes em fase terminal e imunocomprometidos sobrevivam, muitos destes indivíduos acabam por vir a falecer, não devido à doença de que padecem, mas sim devido a infecções oportunistas, onde se incluem as infecções fúngicas (Selitrennikoff *et al.*, 2001).

Os factores de risco que predis põem os doentes a este tipo de infecções podem ser intrínsecos, quando associados ao próprio hospedeiro, e extrínsecos quando incluem a acção de antibióticos de largo espectro, os tratamentos de quimioterapia de longa duração, a imunossupressão induzida do sistema imunitário, o transplante de órgãos, os procedimentos cirúrgicos, queimaduras, hemodiálise e outras situações de risco resultantes de tratamentos hospitalares prolongados e intensivos. As infecções fúngicas podem igualmente estar associadas à utilização de dispositivos médicos como cateteres, próteses, implantes entre outros. (Brajtburg & Bolard 2003, Chandra *et al.* 2001, Yang *et al.* 2003.)

A frequência de infecções por espécies do género *Candida* tem aumentado, tornando-se assim a candidose uma infecção muito comum nos doentes hospitalizados (Bagnoli *et al.* 1990). Actualmente, este tipo de infecções ocupa o 4º lugar dos organismos mais frequentemente relacionados com infecções nosocomiais sistémicas e uma mortalidade que ronda os 35- 40% (Trick *et al.*, 2002).

Do ponto de vista taxonómico são reconhecidas cerca de 200 espécies diferentes de leveduras do género *Candida*, das quais 10% são as que mais frequentemente causam infecções nos seres humanos. Destas, *Candida albicans* é a espécie mais descrita como responsável por infecções hospitalares. As espécies não-*albicans*, tais como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata* podem igualmente causar infecções graves (Pfaller 1996, Rex *et al.* 1994, Wingard 1996).

*Candida albicans* é a espécie mais comum isolada de infecções humanas e é considerada uma das espécies mais patogénicas para o ser humano, causando um elevado número de infecções oportunistas, principalmente em doentes imunodeprimidos, que podem chegar a ser fatais (Baillie *et al.* 1998, Gilfillan *et al.* 1998, Lengeler *et al.* 2000).

É uma espécie comensal que, naturalmente, está presente no ser humano sem causar infecção, coexistindo com o hospedeiro durante toda a sua vida. Pode colonizar o tracto gastro-intestinal, oral, vaginal, respiratório, urinário, sanguíneo, entre outras localizações. Contudo, em doentes imunodeprimidos não só pode causar infecções nas mucosas, nas quais se destacam as candidoses vaginais e as infecções orais, como também infecções sistémicas (O'Sullivan *et al.* 2000).

Embora as candidoses das mucosas sejam a forma mais comum de infecção por esta espécie, as infecções sistêmicas aumentaram particularmente em doentes com sistema imunitário comprometido, particularmente doentes infectados com o vírus da imunodeficiência humana, ou HIV (Chandra *et al.* 2001, Ellepola *et al.* 1998).

Em geral esta espécie é sensível a todos os agentes antifúngicos de uso sistémico embora já estejam descritos casos de resistência adquirida a azóis, quando os doentes são expostos prolongadamente a este fármaco (Sangllard *et al.* 2002).

A espécie *Candida parapsilosis* apresenta-se como um importante microorganismo patogénico hospitalar, sendo responsável por cerca de 7% a 15% das candidémias (Pfaller *et al.* 1996, Voss *et al.* 1996). É frequentemente encontrada na pele, sendo a sua transmissão predominantemente exógena. Tem grande capacidade de produzir biofilmes e prolifera mais facilmente em soluções contendo glicose. Tem uma elevada taxa de ocorrência em crianças e recém nascidos prematuros internados em unidades de cuidados intensivos. Os factores de risco associados à sua transmissão são a nutrição parentérica e o uso prolongado de cateteres (Levy *et al.* 1998).

Os isolados clínicos desta espécie são sensíveis à Anfotericina B e a antifúngicos do grupo dos azóis (Colombo *et al.* 1999, Goldani *et al.* 2003, Costa *et al.* 2000, Godoy *et al.* 2003).

A espécie *Candida tropicalis* apresenta uma elevada prevalência de casos de candidémia em todo o mundo. O seu mecanismo de transmissão é essencialmente endógeno considerando que 50 a 60% dos doentes colonizados por esta espécie desenvolvem infecções sistêmicas. Esta espécie está frequentemente associada a infecções em doentes

neutropénicos que apresentam neoplasias e doenças hematológicas, ou receptores de medula óssea (Wingard *et al.* 1995).

Os isolados clínicos desta espécie são sensíveis à Anfotericina B, e na grande maioria, aos antifúngicos do grupo dos azóis (Colombo *et al.* 1999, Goldani *et al.* 2003, Costa *et al.* 2000, Godoy *et al.* 2003).

*Candida glabrata* surge como outro importante microorganismo patogénico, principalmente em ambiente hospitalar, constituindo a segunda ou terceira espécie mais comum na maioria dos casos de candidémia. Tem particular importância nos casos de candidémia em doentes idosos como nos casos de candidúria (Abi-Said *et al.* 1990). Os isolados clínicos apresentam menos sensibilidade ao Fluconazol, sendo que para alguns autores cerca de 10% das estirpes de *C. glabrata* isoladas a partir do sangue apresentam maior resistência ao Fluconazol (Diekema *et al.* 2002). Como tal, tem sido observada uma maior colonização/infecção por *C. glabrata* em diferentes grupos de doentes expostos prolongadamente ao Fluconazol (Safran. *et al.* 1997). Para além destes problemas terapêuticos associados aos azóis, está também documentada menor susceptibilidade desta espécie à Anfotericina B (Pfaller *et al.* 2001). Outro aspecto interessante sobre a epidemiologia desta espécie, é a sua maior ocorrência em indivíduos idosos, com idade superior a 65 anos (Diekema *et al.* 2002).

*Candida krusei* é uma espécie menos frequente, sendo considerado um microorganismo patogénico hospitalar ocasional. Está particularmente associada a indivíduos portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplantes de medula óssea (Iwen *et al.* 1995). Alguns autores relatam o aumento da incidência de infecções por esta levedura

em indivíduos neutropénicos e expostos, prolongadamente, a tratamentos com Fluconazol (Wingard *et al.* 1995). Esta espécie é, naturalmente, resistente ao Fluconazol, o que talvez explique o seu aumento em indivíduos neutropénicos expostos a tratamentos prolongados com este antifúngico (Diekema *et al.* 2002).

*Candida lusitanae* é uma levedura menos frequente como causa de doença invasiva, embora tenham sido descritos casos de candidémias em indivíduos imunodeprimidos. Os isolados clínicos desta espécie têm, ou uma resistência natural à Anfotericina B ou desenvolvem-na muito facilmente, mas são sensíveis ao antifúngicos azólicos (Merz *et al.* 1994).

### **Factores que favorecem as infecções em meio hospitalar**

São vários os processos que podem facilitar a colonização e posterior infecção do hospedeiro por *Candida* sp., nomeadamente patológicos, fisiológicos ou traumáticos. Entre estes, os mais comuns são a imunodepressão devido a factores como a neutropenia, quimioterapia ou subnutrição (Jarvis *et al.* 1995, Pfaller *et al.* 1996). Outros aspectos podem estar relacionados com a facilidade de entrada do microorganismo no hospedeiro, como o uso prolongado de cateteres, cirurgias e queimaduras extensas (Fridkin *et al.* 1996, Vasquez *et al.* 1993).

Para além disso podem também ocorrer factores combinados, como a utilização prolongada de cateteres associados à antibioterapia, nos quais as leveduras se podem multiplicar no tracto gastrointestinal e na pele. A partir daí, pode ocorrer a disseminação do

microorganismo para a corrente sanguínea, levando a um diagnóstico grave de candidémia (Colombo *et al.* 1999, Colombo *et al.* 2000, Colombo *et al.* 2003, Colombo *et al.* 2006).

Outras manifestações comuns são as infecções a partir da colonização normal da bexiga por espécies do género *Candida* em doentes internados, denominada candidúria (De Oliveira *et al.* 2001). Embora na maioria dos casos seja assintomática, devido apenas à simples colonização do tracto urinário, a candidúria pode ser o início de processos infecciosos mais graves no rim, causando graves lesões com elevadas taxas de morbilidade e mortalidade, consequência da disseminação hematogénea das leveduras para este órgão (De Oliveira. *et al.* 2001, Kauffman *et al.* 2000, Zaoutis *et al.* 2005).

### **Factores de virulência das espécies do género *Candida***

Estes microorganismos sobrevivem como comensais de acordo com o ambiente em que se encontram. Em superfícies mucosas onde há limitação de nutrientes verifica-se uma competição entre bactérias e fungos o que resulta na eliminação dos microorganismos menos adaptados.

Os principais aspectos das interacções da célula com o ambiente que a rodeia são a capacidade de adesão do microrganismo às células e tecidos do hospedeiro e aos dispositivos médicos implantados e a sua resposta imunitária. A adesão das células ao hospedeiro é, na verdade, um passo fundamental para que venha a ocorrer a infecção (Ghannoum *et al.* 2000).

No caso de *Candida albicans* observa-se que há uma aderência da levedura à superfície celular. Os factores mais importantes para desencadear infecções provocadas por estas



leveduras estão relacionados com a formação do tubo germinativo, e consequente desenvolvimento da forma filamentosa, a variabilidade fenotípica e a produção de toxinas e de enzimas extracelulares, como por exemplo de fosfolipase. Esta enzima encontra-se localizada na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo e actua na hidrólise dos fosfolípidos dando origem a lisofosfolípidos que danificam as células epiteliais. Entre as espécies do género *Candida*, *C. albicans* é a única com capacidade para produzir fosfolipase (Finlay *et al.* 1989; Ghannoum *et al.* 2000).

As interacções físicas das leveduras do género *Candida* com as células do hospedeiro são mediadas na superfície celular por adesinas. Outros componentes também importantes no reconhecimento e disseminação da infecção são as proteínas Als1p e Als5p e o gene HWP-1 (Hazen *et al.* 2001).

As outras espécies do género *Candida* também expressam factores de virulência, mas têm sido menos estudados. Possuem enzimas proteolíticas extracelulares capazes de degradar substratos como a albumina e proteínas da matriz extracelular.

A resposta imunitária celular é outro dos factores importantes na defesa do hospedeiro contra invasão fúngica, sugerindo que a imunidade humoral pode constituir um sistema de defesa, juntamente com a imunidade inata (Finlay *et al.* 1989, Shin *et al.* 2002).

### **As infecções por *Candida* sp.**

Sob o ponto de vista clínico, as micoses podem ser classificadas em 3 categorias distintas, de acordo com a sua apresentação e localização:

- Micoses superficiais ou cutâneas;
- Micoses subcutâneas;
- Micoses sistêmicas, profundas ou viscerais.

**As Micoses Superficiais** são doenças provocadas por fungos, os quais ficam limitadas à pele, aos pêlos, às unhas e às mucosas. Geralmente, este tipo de infecções fúngicas é, em algum grau, transmissível.

A espécie patogénica mais comum é a *Candida albicans*, causando uma infecção aguda ou crónica da pele e mucosas (intestino, mucosa oral e vaginal). A forma saprófita pode tornar-se patogénica devido a alterações ambientais do hospedeiro tais como o calor, maceração da pele, alterações na imunidade (como algumas doenças do sistema imunológico, uso prolongado de antibióticos e corticóides). Nas crianças, as localizações mais comuns são: mucosa oral ("sapinhos"), pregas de flexão (axilas, virilhas, pescoço e região das fraldas). Nas mulheres, é a mais frequente a candidose vulvovaginal, podendo também manifestar-se a nível das unhas e das comissuras labiais (Richardson *et al.* 1992)

**Nas Micoses Subcutâneas** os agentes patogénicos podem ser introduzidos de forma traumática através da pele, e disseminarem-se em camadas mais profundas da derme, do tecido subcutâneo e do osso, embora não se costumem disseminar para outros órgãos. Os agentes infecciosos são, muitas vezes, fungos de baixo potencial patogénico, geralmente saprófitas do solo, da madeira e da vegetação em decomposição, o que justifica a comum exposição de forma ocupacional. No entanto, é raro as leveduras do género *Candida* serem responsáveis por este tipo de infecção (Richardson *et al.* 1992)

**As Micoses Sistémicas, Profundas ou Viscerais** incluem as infecções que atingem os órgãos internos do corpo ou se difundem pela circulação sanguínea. Este tipo de infecções ocorre quando o agente patogénico penetra nos tecidos do hospedeiro e se dissemina por diferentes órgãos ou sistemas. Podem ser provocadas por fungos patogénicos ou por fungos oportunistas. Nos primeiros incluem-se os organismos capazes de invadir e de se desenvolverem nos tecidos de indivíduos imunocompetentes. No segundo grupo incluem-se os organismos menos virulentos e menos adaptados ao hospedeiro, que só conseguem penetrar nos tecidos de hospedeiros imunodeprimidos. Neste grupo, estão incluídas as infecções sistémicas causadas por leveduras do género *Candida* (Richardson *et al.* 1992).

### **Diagnóstico convencional das infecções fúngicas**

Diante da variedade de etiologias das candidoses e das suas diferentes manifestações clínicas, é fundamental a utilização de métodos de diagnóstico cada vez mais eficazes a fim de ser instituída a terapêutica mais adequada e atempada.

O diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas inclui a observação directa das amostras biológicas para a pesquisa de elementos fúngicos, a cultura celular, testes bioquímicos e eventualmente testes serológicos e/ou observações histopatológicas. A observação directa é um método rápido e de baixo custo mas, na maioria dos casos, não permite a identificação da espécie ou mesmo do género dos fungos que não apresentem estruturas morfológicas parasitárias típicas, como os pertencentes aos géneros *Candida* ou *Aspergillus*.

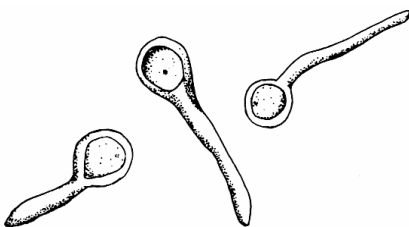
A cultura celular é um importante método de diagnóstico para a identificação de espécies de fungos pois, ainda é o *gold standard* e o método mais seguro de identificação das espécies fúngicas. Porém, a cultura celular pode demorar semanas para a obtenção de um resultado definitivo, sendo que, em geral, o clínico é impelido a iniciar um tratamento empírico antes de ter o resultado do diagnóstico laboratorial. Entre as ferramentas de diagnóstico utilizadas directamente a partir da cultura existem os meios cromogénicos, como o CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> (BBL), no qual a identificação das espécies do género *Candida* é feita através da observação da cor que as colónias desenvolvem nesse meio de cultura. (Koneman *et al.* 1997, Midgley *et al.* 1998).

As espécies do género *Candida*, geralmente, crescem bem em meios de composição relativamente simples como o Sabouraud dextrose, desenvolvendo colónias com um aspecto característico (Lacaz *et al.* 2002). Na sua maioria, produzem colónias glabras, de coloração branca ou bege, textura cremosa e superfície lisa.

Há metodologias utilizadas para a identificação e diferenciação das espécies do género *Candida*, entre os quais testes fenotípicos que incluem a análise da assimilação de compostos, principalmente de hidratos de carbono, da temperatura de crescimento, da diferenciação do aspecto das colónias em meio CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> e, cada vez menos usado na rotina laboratorial, da produção de clamidósporos. Entretanto, estes testes apresentam algumas limitações, uma vez que a espécie de *C. dubliniensis* apresenta características fenotípicas muito semelhantes a *C. albicans*, exigindo a realização de outros procedimentos, nomeadamente, métodos moleculares (Mahnss *et al.* 2005, McCllough *et al.* 1995).

A prova da filamentação ou Teste da Blastese permite fazer uma identificação presuntiva das espécies *Candida albicans* e *C. dubliniensis*, quando as leveduras são incubadas em

soro ou plasma, a 37°C durante cerca de 2,5 horas (Figura 1). A formação de um tubo germinativo é o início de uma verdadeira hifa que, por não ser uma pseudohifa, não apresenta constrição na sua base. Somente as leveduras das espécies acima citadas formam tubos germinativos enquanto as restantes espécies não os formam. Assim, têm de ser identificados por outros métodos, como por exemplo, por métodos bioquímicos (APIs) ou por métodos moleculares (Chaffin *et al.* 1998, Consolaro *et al.* 2005, Hammer, *et al.* 2000, Lo *et al.* 1997).



**Figura 1:** Representação da formação de tubo germinativo de *Candida albicans* na prova de filamentação.

Existe outro teste que permite de modo mais rápido a identificação destas espécies, o teste Bichro-Latex Albicans® (Fumouze). Este é um teste de aglutinação em latex que permite a identificação de leveduras de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*, directamente a partir de colónias isoladas, utilizando um anticorpo monoclonal específico.

Os testes bioquímicos para a identificação de leveduras baseiam-se na capacidade de assimilação, por via aeróbia ou fermentativa, de diferentes compostos, principalmente de açúcares. Hoje em dia a maior parte dos laboratórios de diagnóstico microbiológico usam sistemas automatizados vendidos comercialmente, que executam os testes de identificação

bioquímica de leveduras. Os sistemas automatizados de identificação mais correntemente usados nos laboratórios de diagnóstico microbiológico hospitalar são o VITEK<sup>®</sup> (bioMérieux) e o WalkAway<sup>®</sup> (Baxter Diagnostic, Inc., WestSacramento, California) em virtude de permitirem o processamento rápido de um número elevado de amostras com pouca intervenção humana (Koneman *et al.* 1997, Midgley *et al.* 1998). O sistema VITEK<sup>®</sup>, tem automatizado todos os passos necessários para executar testes de identificação e susceptibilidade utilizando as cartas VITEK<sup>®</sup>, ou mais concretamente, cartas de leveduras YST<sup>®</sup>. Estas baseiam-se em métodos bioquímicos já conhecidos e incluem os substratos necessários para a identificação de leveduras. As cartas possuem 46 testes bioquímicos que medem a utilização da fonte de carbono, a utilização da fonte de azoto e a actividade enzimática. Este sistema tem capacidade entre 32 a 480 cartas, dependendo do modelo e inclui um inoculador/selador que permite a inoculação de cartas em poucos minutos e um incubador/leitor que incuba e lê em simultâneo as cartas, e tem capacidade. Os resultados finais estão disponíveis ao fim de aproximadamente, 18 horas. A automatização do sistema VITEK<sup>®</sup> oferece maior segurança e elimina as operações manuais repetitivas. A diminuição do tempo de resposta permite que os resultados possam ser fornecidos mais rapidamente, em comparação com as técnicas manuais.

No entanto em laboratórios com um menor volume de amostras, há comercialmente disponível um conjunto diversificado de galerias de testes bioquímicos fabricadas por diferentes laboratórios como, por exemplo, RapID Yeast Plus system<sup>®</sup> (Innovative Diagnostic Systems), Auxacolor<sup>®</sup> (Sanofi Diagnostics Pasteur), Fungichrom (Wescor, Inc Biomedical Division), API 20C<sup>®</sup> (bioMérieux) e ID32C<sup>®</sup> (bioMérieux) que, apesar de mais lentos na resposta, conseguem fornecer resultados mais precisos. O sistema ID32C<sup>®</sup>

(BioMerieux), consiste em 32 galerias com compostos liofilizados, dos quais 29 correspondem a testes de assimilação de (hidratos de carbono, ácidos orgânicos e aminoácidos), 1 teste de sensibilidade (cicliheximida), 1 teste colorimétrico (esculina) e um controlo negativo. Após incubação de 24 a 48 horas a 30°C, a leitura é feita visualmente ou automaticamente, pela presença de crescimento que se verifica pela turvação nos poços de cada galeria. Os resultados são, posteriormente, transformados num perfil numérico e os isolados são identificados através de uma base de dados.

Segundo os fabricantes, os testes serológicos apresentam alta especificidade e sensibilidade mas na realidade podem ser influenciados por outros factores, como as características individuais de cada soro, o microorganismo infectante e a resposta imunitária do hospedeiro contra o agente infeccioso. Por estes motivos, os resultados obtidos por vezes não são reprodutíveis (Albuquerque *et al.* 2005).

Os testes histopatológicos são utilizados no diagnóstico principalmente das infecções sistémicas invasivas. Em cortes histológicos, as células fúngicas podem ser coradas com hematoxilina e eosina, ou metanina de prata e *Periodic Acid Schiff* (PAS). Apesar dos bons resultados, em alguns casos o agente etiológico pode passar despercebido, principalmente quando existem poucos elementos fúngicos no tecido ou, pelo contrário, ser confundido com fungos de outras espécies, nomeadamente formas leveduriformes de espécies dimórficas como *Histoplasma capsulatum* ou *Coccidioides immitis* (Brummer *et al.* 1993).

## Diagnóstico molecular em Micologia Médica

Uma vez que os testes comerciais podem levar por vezes a erros na identificação, actualmente são cada vez mais utilizados métodos moleculares que visam à identificação mais acurada das espécies infectantes. Na verdade estas técnicas apresentam um grande potencial para estudos de identificação e de diversidade de fungos, sem os problemas de variação dos caracteres morfológicos que dificultam a taxonomia tradicional.

Estes métodos permitem igualmente distinguir estirpes diferentes de uma mesma espécie e determinar se uma determinada estirpe de levedura presente no ambiente hospitalar é igualmente isolada a partir de infecções em doentes internados, e assim associá-la a processos infecciosos nosocomiais. Com base nos resultados obtidos podem indicar-nos igualmente, um mecanismo de transmissão comum (Pfaller 1994, Taylor *et al.* 2003). Futuramente, depois de optimizadas as condições, poderão inclusivamente, apresentar a vantagem de detectar mais precocemente as infecções fúngicas, mesmo antes do aparecimento dos primeiros sintomas clínicos e serão muito utilizadas no acompanhamento de doentes de risco, como no caso de doentes transplantados (Badiee *et al.* 2007).

Embora não sendo ainda universalmente aplicadas na rotina laboratorial do diagnóstico das infecções fúngicas clínicas, por ainda não haver procedimentos padronizados e por exigirem equipamentos específicos e dispendiosos, as metodologias moleculares baseadas na PCR (*Polimerase Chain Reaction*) são no entanto muito promissoras, principalmente devido à sua rapidez na obtenção de resposta e elevada sensibilidade e especificidade (Sandhu *et al.* 1997, Goldani *et al.* 1998, Montoyam *et al.* 2000, Bialek *et al.* 2000). Nestes procedimentos são amplificados fragmentos de DNA das leveduras utilizando oligonucleótidos específicos, como *primers*, os quais são separados electroforeticamente



em função do seu tamanho, permitindo identificar as diferentes espécies (Morace *et al.* 1997, Wahyuningsih *et al.* 2000).

Muitas outras técnicas moleculares utilizadas na tipagem de microorganismos através da análise de fragmentos de DNA amplificados por PCR podem igualmente ser aplicadas nos fungos como, por exemplo, as que se baseiam na electroforese em campo pulsado (PFGE), na análise de fragmentos de genoma gerados pela amplificação aleatória de DNA (RAPD) ou, após digestão com endonucleases de restrição, na separação dos fragmentos por electroforese em gel de agarose (RFLP) (Boccia *et al.* 2002, Clark *et al.* 2004, Colombo *et al.* 1999, Mehta *et al.* 1999, Rho *et al.* 2004).

### **RFLP's (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*)**

A análise dos polimorfismos de fragmentos de restrição, *Restriction Fragment Length Polymorphisms* ou RFLP é um método rápido e simples de executar, requer apenas equipamento comum de Biologia Molecular e fornece resultados facilmente reproduzíveis, sendo facilmente adaptável à maioria dos laboratórios de diagnóstico (Mirhendi *et al.* 2005, Mirhendi *et al.* 2006).

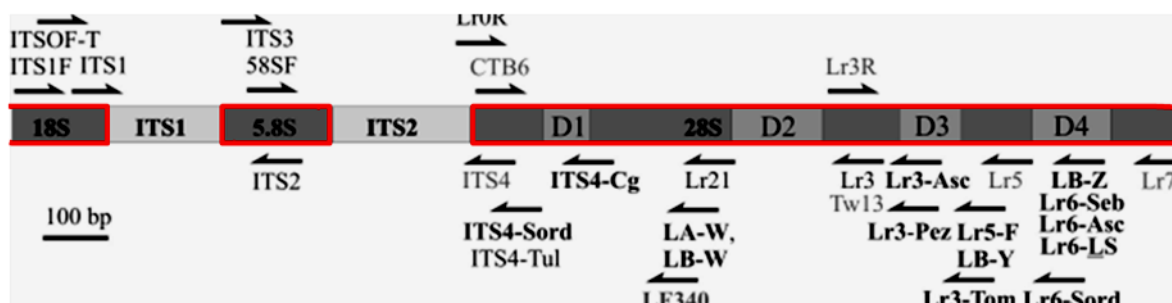
Esta técnica tem sido utilizada na tipagem de diferentes microorganismos e baseia-se na hidrólise do DNA por enzimas de restrição e posterior separação electroforética dos fragmentos gerados que correspondem a padrões de restrição específicos para cada espécie ou estirpe, consoante a enzima utilizada.

Têm sido sugeridas diferentes regiões-alvo para a amplificação de regiões do genoma de espécies do género *Candida* passíveis de permitir a identificação por RFLP. O genoma

possui uma vasta complexidade e muitos genes se têm mostrado úteis para inferir relações filogenéticas. O melhor exemplo da ampla utilização de genes nucleares em estudos filogenéticos é a unidade de repetição do DNA ribossômico (rDNA), a qual tem sequências intercalares que variam dentro e entre populações e sequências codificadoras que são altamente conservadas, que podem servir como marcadores para comparação entre diferentes taxonomias (Reiss *et al.* 1998).

Os genes ribossômicos têm sido alvos muito utilizados em sistemas de detecção por PCR e na identificação de fungos patogênicos (Kappe *et al.* 1998, Reiss *et al.* 1998), mas a identificação de diferentes estirpes torna-se difícil devido à pouca variação entre as espécies de leveduras ao nível das subunidades 18S e 28S rDNA (Einsele *et al.* 1997, Kappe *et al.* 1998, Reiss *et al.* 1998).

As regiões ITS1 e ITS2 (figura 2) são, pelo contrário, sequências altamente variáveis e têm sido usadas na identificação diferentes espécies de fungos (Einsele *et al.* 1997, Reiss *et al.* 1998).



**Figura 2:** Esquema representativo da organização dos genes ribossômicos e dos primers universais e específicos mais utilizados na identificação de leveduras do gênero *Candida*.

Uma vez que estirpes distintas apresentam diferenças nas sequências nucleotídicas ao nível do genoma, ainda que por vezes mínimas, esta técnica explora a possibilidade dessas diferenças se encontrarem no interior da sequência de reconhecimento da(s) enzima(s) de restrição utilizada(s) possibilitando a sua diferenciação. Por outro lado, estirpes que tenham sofrido mutações, certas enzimas deixam de conseguir reconhecer uma dada sequência de restrição e, conseqüentemente, deixando de haver corte, não aparece uma certa banda electroforética. Através da comparação dos perfis resultantes será então possível detectar pequenas alterações que diferenciem as estirpes, desde que essas modificações ocorram nas sequências de reconhecimento das enzimas usadas (Mirhendi *et al.* 2005, Mirhendi *et al.* 2006, McCullough *et al.* 1999, Morace *et al.* 1997)

### **Estudo da Susceptibilidade aos Antifúngicos**

Os estudos de susceptibilidade aos antibióticos podem ser usados na pesquisa de novos fármacos, em estudos epidemiológicos, na definição de novas terapêuticas, principalmente, e na determinação do fármaco ou dos fármacos mais eficazes no combate às infecções causadas por microorganismos patogénicos (Rex *et al.* 2001).

No entanto, os testes de susceptibilidade *in vitro* podem ser influenciados por numerosos factores tais como a dimensão do inóculo utilizado, a temperatura e tempo de incubação, a composição do meio de cultura e o pH do mesmo.

Foi demonstrado que o aumento da concentração do inóculo pode levar a um aumento da concentração mínima inibitória (CMI). Por outro lado, a temperatura e o tempo de incubação do microorganismo podem também ter alguns efeitos significativos na

determinação da CMI, que tende a aumentar com o tempo de exposição do fungo ao antifúngico (Ghannoum *et al.* 1999, Chen *et al.* 1996, White *et al.* 1998).

O meio de cultura utilizado nos testes é fundamental, uma vez que este interage com os fármacos utilizados. Um pH baixo pode estar associado a valores elevados de CMI e como tal é importante definir e fixar um determinado valor de pH para cada teste (Brown *et al.* 2003). Como consequência surgiu a necessidade de padronizar todos os procedimentos laboratoriais na determinação da sensibilidade aos antifúngicos. O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) consequentemente publicou o documento M27-A2 com o intuito de normalizar as metodologias de susceptibilidade aos antifúngicos em leveduras, passando este a funcionar como método de referência.

### **Os agentes Antifúngicos**

Os agentes antifúngicos utilizados no tratamento de micoses invasivas são classificados de acordo com o tipo de acção que exercem sobre as células dos fungos (Rex *et al.* 2001). Os antifúngicos mais utilizados pertencem à classe dos polienos, como a Anfotericina B, dos nucleósidos análogos, como a 5-fluorocitosina e dos azóis, como o fluconazol, o itraconazol e o voriconazol (Andriole *et al.* 2002). Mais recentemente surgiram as equinocandinas, um grupo especial de antifúngicos cujo modo de acção tem como alvo a inibição da síntese de  $\beta$ -(1,3)-D-glucano que, sendo um componente da parede celular de numerosas espécies fúngicas patogénicas, vai provocar alterações estruturais conduzindo à lise das células (Rex *et al.* 2001).

Os polienos são metabolitos secundários produzidos por várias espécies de *Streptomyces*. Têm um largo espectro de acção fungicida, o mais largo de todos os antifúngicos disponíveis. Formam complexos com o ergosterol e rompem a membrana plasmática, o que leva ao aumento da permeabilidade da membrana, libertando o conteúdo intracelular e acabando por conduzir à morte das células fúngicas (Adriole *et al.* 1999).

Os nucleósidos análogos, inibem o metabolismo das pirimidinas, interferindo com a síntese proteica e o RNA das células (Adriole V.T. 1999).

Os azóis são o maior grupo de antifúngicos disponíveis comercialmente. Têm um largo espectro de acção antifúngica, inibindo a biossíntese do ergosterol, pela inibição da enzima 14- $\alpha$ -dimetilase do citocromo P-450 responsável pela dimetilação do lanosterol. Os azóis são altamente selectivos e actuam por ligação ao grupo heme do citocromo P-450 (Adriole V.T. 1999).

### **Anfotericina B**

A Anfotericina B tem vindo a ser usada há mais de 30 anos e mantém-se como um dos antifúngicos mais utilizados no tratamento das infecções mais graves. A grande desvantagem deste agente é o facto de não ser solúvel em água, sendo feita uma associação da anfotericina com um detergente deoxilato em tampão fosfato, o Fungizone. Contudo, este fármaco apresenta alguns efeitos secundários para o doente com elevada nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. De modo a combater esses efeitos secundários têm vindo a desenvolver alternativas a este combinado como as formulações lipídicas (Brajtburg *et al.* 2003).

A anfotericina B pertence ao grupo dos polienos com 7 ligações duplas de carbono. É o único composto poliénico clinicamente útil, uma vez que tem maior actividade sobre as membranas fúngicas do que sobre as membranas das células dos mamíferos. Isto deve-se à sua ligação preferencial a membranas que contêm ergosterol em vez de colesterol. (Burgess *et al.* 2000). A anfotericina B actua ao nível da membrana, intercalando-se entre as moléculas do ergosterol, formando canais que permitem a passagem dos compostos citoplasmáticos, nomeadamente iões de potássio, provocando um desequilíbrio no gradiente de protões, acabando por provocar a morte da célula (Ghannoum *et al.* 1999, White *et al.* 1998).

### **Fluconazol**

O fluconazol é, actualmente, um dos agentes antifúngicos mais utilizados no tratamento de infecções causadas por fungos oportunistas. Está inserido no grupo dos azóis, pela estrutura da molécula e pela sua acção na parede celular.

Quando administrado, o fluconazol é muito bem tolerado e provoca poucos efeitos secundários. É um dos agentes mais eficazes no tratamento da orofaringe e do esófago, especialmente em doentes imunossuprimidos, como o caso de doentes com SIDA e cancro, sendo também muito eficaz na candidose vaginal (Andriole *et al.* 1999, Andriole *et al.* 1998, Groll *et al.* 2004, Bodey *et al.* 1993). O fluconazol actua nas células inibindo a síntese do ergosterol ao nível da enzima 14- $\alpha$ -dimetilase do citocromo P-450 (White *et al.* 1998).

### **Voriconazol**

É uma molécula derivada do fluconazol, através de alterações na estrutura molecular, que lhe conferem uma maior potência e actividade antifúngica. Apresenta um espectro de maior

actividade, essencialmente para espécies de fungos filamentosos como *Aspergillus* sp. e para espécies de *Candida* com resistência intrínseca ao fluconazol, como *Candida krusei*. Tem uma actividade intrínseca superior face às espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*.

O seu mecanismo de acção consiste na inibição do ergosterol, que corresponde a uma estrutura lipídica semelhante ao colesterol nos mamíferos, que confere estabilidade à membrana celular fúngica. É interessante destacar que o voriconazol apresenta actividade fungistática para as leveduras e fungicida para os fungos filamentosos. Este comportamento explica-se devido a dois factores: maior actividade intrínseca na inibição da enzima 14-alfa-esterol desmetilase nos fungos filamentosos e devido à acumulação dos precursores do ergosterol, que são mais tóxicos nos fungos filamentosos do que nas leveduras (Johnson *et al.* 2003, Keating *et al.* 2001).

### **Determinação da susceptibilidade aos antifúngicos**

A avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos é feita de acordo com a determinação da viabilidade, actividade ou crescimento de células de leveduras, quando em contacto com o agente infeccioso.

O tempo de exposição foi definido para que pudesse ser feita uma correcta monitorização do crescimento das leveduras quando expostas a um antifúngico. As 48h seriam o tempo apropriado para que a leitura das concentrações mínimas inibitórias (CMI) das espécies de *Candida* permitisse observar 80% da inibição do crescimento. Contudo, numa tentativa de melhorar a relação dos resultados da CMI *in vitro*, com actuação do próprio fármaco, alguns

autores sugerem encurtar o tempo de incubação para 24h, definindo como critério 50% da inibição de crescimento (Sheedan *et al.* 1999, Colombo *et al.* 1995).

Existem vários métodos utilizados na determinação da susceptibilidade de leveduras aos antifúngicos. Os métodos de difusão utilizam meios de cultura sólidos em placas de Petri, a inocular com uma dada suspensão fúngica por espalhamento na superfície do meio. Depois de realizado o inóculo, colocam-se discos de papel impregnados com os diferentes antifúngicos. Após incubação à temperatura adequada, durante um período bem definido, medem-se os halos de inibição formados à volta dos discos de papel impregnado com o antifúngico. O tamanho dos halos expresso em milímetros (mm), é traduzido em susceptível ou resistente. Vários parâmetros podem influenciar o tamanho do halo, pelo que esta técnica tem sido padronizada - técnica de Kirby-Bauer.

Estes métodos baseados no crescimento celular em meio sólido e que aplicam a metodologia desenvolvida pelo CLSI (antigo NCCLS) apresentam no entanto, algumas desvantagens, nomeadamente quando se trata de agentes antifungistáticos. A determinação do valor a partir do qual o antifúngico deixa de actuar não é muito precisa, pelo facto deste tipo de antifúngicos apenas inibir parcialmente o crescimento, tornando difícil a determinação do valor exacto da CMI (Chen *et al.* 1996, Favel *et al.* 1997, Pfaller *et al.* 1996).



## **Resistência aos antifúngicos**

Os novos azóis, como o fluconazol e itraconazol e mais recentemente o voriconazol, de administração oral ou intravenosa, são actualmente os mais utilizados no tratamento de micoses. Estes fármacos são utilizados na profilaxia em doentes com risco de desenvolver infecções fúngicas, uma vez que são menos tóxicos do que os polienos. A anfotericina B, um fármaco poliénico, tem sido o mais utilizado para o tratamento de infecções fúngicas sistémicas, mais graves, mas a sua toxicidade é limitadora do seu uso (Burgess *et al.* 2000). Com a introdução dos antifúngicos azólicos mais recentes, iniciou-se uma nova era no tratamento das infecções fúngicas. O seu largo espectro de acção inclui leveduras e fungos dimórficos.

Têm sido observadas, com maior ou menor frequência, o isolamento de espécies de leveduras com pouca susceptibilidade ou até resistentes a antifúngicos e esta resistência pode ser observada tanto *in vivo* como *in vitro*. A primeira pode ser consequência de uma baixa dose de concentração no fármaco, devido à sua interacção com outros fármacos ou ao enfraquecimento ou mesmo supressão da acção do sistema imunitário do doente. A resistência *in vitro* pode ser do tipo secundária, onde espécies susceptíveis se transformam em resistentes, devido a um contacto prévio com o agente antifúngico. É consensual que a resistência ao fármaco depende da interacção entre o hospedeiro, o agente antifúngico e a espécie, sendo que os factores relacionados com o hospedeiro, nomeadamente a resposta do sistema imunitário, são os mais importantes para o surgimento de resistências (Silva *et al.* 2002, Marr *et al.* 2000, Nucci *et al.* 2002).

## **O Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E.**

A maioria das espécies de leveduras do género *Candida* tem distribuição mundial, sendo ubiqüitárias e fazendo parte da flora endógena da pele, mucosas, da orofaringe, vagina e do tracto gastrointestinal. Tais leveduras podem provocar infecções oportunistas e estas infecções (candidoses) são das infecções fúngicas mais frequentes, apresentando um espectro muito variado (Sullivan *et al.* 1995)

As infecções hospitalares causadas por fungos têm constituído um problema de saúde pública, constituindo uma causa crescente de morbilidade e mortalidade, afectando tanto pacientes internados, como profissionais de saúde (Trick *et al.* 2002)

Face ao exposto, considera-se ser importante e ter relevância clínica, o estudo da ocorrência das diferentes espécies do género *Candida*, bem como a avaliação da susceptibilidade ao Fluconazol e Voriconazol, provenientes de doentes com infecção, residentes na área abrangida pelo Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E.

O Centro Hospitalar Cova da Beira E.P.E., engloba o Hospital Distrital da Covilhã, o Hospital Distrital do Fundão e o Departamento de Psiquiatria e Saúde Mental, tendo assumindo o C.H.C.B. E.P.E. todos os seus direitos e obrigações a partir de 2000 (data de inauguração das novas instalações). Esta unidade hospitalar, a maior de toda a região, encontra-se entre os mais modernos e capacitados hospitais do país, sendo até uma referência a nível europeu em certas áreas.

A nível do internamento está dotado com 372 camas e possui 18 valências. A Consulta externa divide-se em 27 especialidades e a Urgência/ Serviço de observação (SO) compreende a Urgência geral/ SO geral, Urgência pediátrica/ SO pediátrico e a Urgência ginecológica/ Obstétrica. São ainda 18, as especialidades relativas aos meios complementares de diagnóstico e terapêutica. Em termos gerais o C.H.C.B. compreende as seguintes valências (Fonte CHCB):

- Cirurgia Geral
- Anestesiologia
- Ginecologia
- Obstetrícia
- Medicina Interna
- Cardiologia
- O.R.L.
- Ortopedia
- Pediatria
- Clínica Geral
- Psiquiatria
- Urologia
- Oftalmologia
- Gastroenterologia
- Pneumologia
- Fisiatria
- Neurologia
- Pedopsiquiatria
- S.O.
- Dermatologia
- Oncologia
- Unidade de Cuidados Intensivos
- Anatomia Patológica
- Neonatologia
- Imunoalergologia
- Patologia Clínica
- Internamento
- Imagiologia
- Exames Especiais
- Estomatologia
- Hematologia
- Imunohemoterapia
- Unidade de Cuidados Paliativos
- Gabinete Medico-Legal

Muitos são os doentes internados e os que acorrem às consultas externas do C.H.C.B, E.P.E. que apresentam sintomas de infecções oportunistas causadas por leveduras do

gênero *Candida*, principalmente os doentes internados nas áreas de Unidade de Cuidados Intensivos, Medicina interna, Cirurgia e Urgência. Para além disso, verifica-se igualmente uma ocorrência significativa de doentes provenientes da Consulta externa, o que constitui um sinal importante de morbilidade, possibilitando assim a realização deste trabalho.

## Objectivos do Trabalho e Plano da Dissertação

A Micologia Medica é uma área que se encontra em fase de expansão em consequência da emergência de novos fungos patogénicos nestes últimos anos, bem como do aumento do número de casos de infecções fúngicas. Este aumento de incidência tem levado a que clínicos e investigadores tenham vindo a desenvolver novas técnicas de diagnóstico, visando a sua rapidez, sensibilidade e especificidade na identificação dos agentes etiológicos.

Neste contexto, e realçando a importância que o diagnóstico micológico representa na medicina em geral, principalmente para a prescrição do tratamento adequado a uma determinada patologia fúngica, o presente trabalho teve como principais objectivos:

- a identificação molecular de candidoses invasivas através de uma metodologia molecular de diagnóstico rápida e eficaz, mas que fosse simples e fácil de implementar em laboratórios de diagnóstico microbiológico.
- a comparação de métodos de identificação de leveduras do género *Candida* – métodos tradicionais fenotípicos vs métodos moleculares.
- a aquisição de conhecimentos que permitissem um correcto diagnóstico micológico das espécies de leveduras causadoras de infecção invasiva.
- comparação do efeito de dois antifúngicos mais utilizados em medicina (Fluconazol e Voriconazol), utilizando dois métodos diferentes (E-test e Método de Difusão em Disco) para a determinação da susceptibilidade ou da resistência dos isolados clínicos aos fármacos de acordo com a norma M44-P do CLSI (NCCLS, 2003).
- avaliar a ocorrência das diferentes espécies do género *Candida* como agentes etiológicos de infecção fúngicas no Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, em parceria com o Serviço de Microbiologia do Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira E.P.E.

O trabalho baseou-se na identificação molecular (PCR-RFLP) de espécies do género *Candida*, em comparação com os métodos de diagnóstico tradicionais (CHROMagar® *Candida* e VITEK® - bioMérieux) utilizados no laboratório hospitalar.

Esta dissertação está dividida em 4 capítulos.

No primeiro capítulo é feita uma introdução geral sobre as leveduras patogénicas do género *Candida*, quais os factores que favorecem as infecções em meio hospitalar, os factores de virulência das espécies do género *Candida* e quais os tipos de infecção provocadas por esta levedura.

O segundo capítulo incide sobre o diagnóstico de leveduras de interesse clínico por métodos convencionais (caracterização fenotípica e morfológica; teste da blastese; exame directo; testes serológicos; testes bioquímicos) e diagnóstico molecular, nomeadamente na técnica utilizada neste estudo, RFLP's (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*).

O terceiro capítulo é dedicado ao estudo da sensibilidade *in vitro* de espécies do género *Candida* aos antifúngicos Fluconazol, Voriconazol e Caspofungina, através dos métodos, de difusão em disco e E-Test®, segundo os procedimentos padronizados e publicados pelo CLSI.

Finalmente, no quarto capítulo são apresentadas as conclusões e considerações gerais sobre os resultados obtidos no presente trabalho.



## 1. ORIGEM DAS ESTIRPES ESTUDADAS

Para a realização deste estudo foram seleccionados 100 isolados clínicos de leveduras obtidas a partir de amostras clínicas enviadas para o Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira E.P.E. para o diagnóstico laboratorial de infecção fúngica durante um período de 8 meses, desde Novembro de 2008 até Junho de 2009 (Anexo IV).

Os isolados foram provenientes de doentes de ambos os sexos (Tabela 1), entre os quais, 54 do sexo feminino e 46 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 7 e os 94 anos.

**Tabela 1:** Número de amostras clínicas estudadas em relação ao sexo dos doentes.

<i>Sexo</i>	<i>Número de doentes</i>
Feminino	54
Masculino	46

Os produtos biológicos a partir dos quais as leveduras foram isoladas foram obtidos a partir de doentes internados em diferentes serviços clínicos (Tabela 2), nomeadamente da Unidade de Cuidados Intensivos, Medicina Interna, Cirurgia, Urgência, Gastroenterologia, Ginecologia, Neurologia, Reumatologia, Cardiologia e Neurologia do Centro Hospitalar Cova da Beira E.P.E. e de doentes provenientes da Consulta Externa, Consulta de Planeamento Familiar e Centro de Saúde.



**Tabela 2:** Número amostras clínicas estudadas em relação aos serviços clínicos do Centro Hospitalar da Cova da Beira, EPE que as enviaram para diagnóstico laboratorial.

<i>Serviço de Origem</i>	<i>Número de amostras</i>
<i>U.C.I.</i>	30
<i>Medicina</i>	39
<i>Cirurgia</i>	9
<i>Consulta Externa</i>	5
<i>Urgência</i>	4
<i>Outros</i>	13
<b>Total</b>	100

As culturas foram obtidas a partir de diferentes tipos de produtos biológicos (tabela 3) como sangue, expectoração, urina, aspirados brônquicos, exsudados, secreções brônquicas, outros líquidos biológicos e pontas de cateter.

**Tabela 3:** Número de isolados obtidos a partir das diferentes amostras clínicas enviadas para diagnóstico laboratorial.

<i>Produto biológico</i>	<i>Número de amostras</i>
<i>Urina</i>	41
<i>Expectoração/Aspirado brônquico</i>	22
<i>Exsudados vaginais</i>	9
<i>Exsudados/Pus</i>	9
<i>Sangue</i>	8
<i>Líquidos biológicos</i>	6
<i>Cateteres</i>	3
<i>Outros</i>	2
<b>Total</b>	100

## 2. MÉTODOS CONVENCIONAIS DE IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS DE INFECCÕES

### 2.1 Isolamento, Identificação e Manutenção dos Isolados

Todos os isolados foram obtidos de culturas positivas em meio de Sabouraud (peptona 1%, dextrose 4%, agar 2%) adicionado de gentamicina e cloranfenicol, após sementeira das amostras clínicas e incubação a 30°C durante 24 a 48 horas (Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol<sup>®</sup> ou SGC<sup>®</sup> – BioMerieux, França). Este meio de cultura contém peptona e glucose, que favorecem o crescimento das leveduras e tem um pH entre 5 e 5,6 que dificulta o crescimento das bactérias, embora não o evita. A gentamicina que lhe é adicionada inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram positivas e Gram negativas e o cloranfenicol melhora a selectividade do meio em relação a algumas espécies de *Streptococcus* e *Proteus*, que possam eventualmente ser resistentes à gentamicina. Esta composição permitiu o isolamento selectivo das leveduras incluídas neste estudo, inibindo o crescimento da flora bacteriana mista própria das mucosas, como por exemplo da mucosa vaginal, da expectoração ou da urina.

Muitas das leveduras cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira E.P.E. ainda vinham crescidas em meio CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> que permitiu uma identificação presuntiva da espécie em causa, caso pertencesse a uma das três espécies, *C. tropicalis*, *C. albicans* ou *C. krusei*. Este meio cromogéneo costuma ser muito utilizado pelos laboratórios de diagnóstico dos hospitais para o diagnóstico *in vitro*, através do isolamento e diferenciação de espécies do género *Candida*, directamente a partir de amostras clínicas, a partir da própria primocultura. Tem a

particularidade de ter uma mistura de substratos cromogéneos, cada um deles específico para enzimas de cada uma das espécies em causa (tabela 4). Segundo o fabricante, a especificidade e sensibilidade para *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. krusei* excedem os 99%.

**Tabela 4:** Cor desenvolvida pelas de leveduras do género *Candida* crescidas no meio CHROMagar *Candida*.<sup>®</sup>

<i>Microorganismo</i>	<i>Aspecto característico das colónias</i>
<i>C. albicans</i>	Verde
<i>C. tropicalis</i>	Azul metálico
<i>C. krusei</i>	Rosa, rugosa
<b>Outras espécies</b>	Branco a violeta

## 2.2. Caracterização morfológica das leveduras

Embora as características morfológicas das leveduras tenham um valor muito relativo por serem pouco diferenciáveis na identificação das espécies, foi observada a morfologia macroscópica de todos os isolados em meio de Sabouraud ao fim de 24 a 48 horas de incubação a 30°C, nomeadamente a cor, textura, superfície, relevo e margem das colónias.

## 2.3. Identificação de *C. albicans*

A prova da filamentação ou teste da blastese permite fazer uma identificação presuntiva de *C. albicans* e de *C. dubliniensis*, a partir de células de levedura, pela observação microscópica da formação de tubos germinativos que correspondem ao início de uma verdadeira hifa. É de realçar que na prova da filamentação os verdadeiros filamentos não apresentam constrição no seu ponto de origem (Chaffin *et al.* 1998, Consolaro *et al.* 2005, Hammer *et al.* 2000, Lo *et al.* 1997).

No entanto, é necessário ter alguns cuidados na realização desta prova para que conduza a resultados fidedignos. Não devem ser utilizadas colónias envelhecidas para não transferir para o soro verdadeiras hifas induzindo a resultados falso positivos. Por outro lado, a suspensão não deve ser demasiado densa porque a capacidade de produção de tubos germinativos é inversamente proporcional à quantidade de inóculo de levedura. Em terceiro lugar a incubação não deve exceder as 3 horas para que leveduras não-*albicans* produzam pseudofilamentos (apresentam constrição) que induzem a falsas identificações de *C. albicans*.

Num eppendorf de 1,5 ml com cerca de 200 µl de soro humano (também pode ser utilizada gema de ovo em vez de soro), inocula-se um pouco de cultura da levedura com uma ansa, tendo o cuidado de obter, no final, uma suspensão homogénea. Para tal começa-se por humedecer a levedura na parede interior do tubo eppendorf próximo da superfície do líquido e, aos poucos, adicionando pequenas quantidades de soro, liquefaz-se a porção pastosa da levedura até se obter uma suspensão cada vez mais líquida e homogénea. Em seguida, com o auxílio da ansa, homogeneiza-se toda a suspensão e agita-se no vórtex. Incuba-se a suspensão à temperatura de 37°C durante um período de 2 a 2,5 horas, após o que se observa um pouco ao microscópio, entre lâmina e lamela.

Este teste é muito fácil, rápido e económico mas o seu maior inconveniente é não diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

No caso de alguns isolados darem resultados ambíguos ou inconclusivos, foi realizada a identificação de *C. albicans* utilizando o teste BICHRO-LATEX ALBICANS® (Fumouse, França).

Este teste consiste numa reacção de aglutinação em látex, e é mais sensível para a identificação desta espécie. Somente foi efectuado para um pequeno número de isolados,

não só pelo seu custo ser elevado, como também por o teste da blastese se ter revelado bastante eficiente na grande maioria dos casos (95% dos isolados de *C. albicans* formam tubo germinativo).

O teste Bichro-Latex Albicans<sup>®</sup> é um teste rápido que permite a identificação de leveduras de *Candida albicans* e *Candida dublinienses*, directamente a partir das colónias crescidas em primocultura. Quando o reagente de latex é adicionado a uma suspensão feita a partir de colónias de *C. albicans* ou *C. dublinienses* previamente homogeneizadas com o agente dissociante, ocorre a aglutinação entre os blastosporos, que possuem o antigénio, e as partículas de latex sensibilizadas com o anticorpo monoclonal.

Uma reacção positiva é visível quando se formam aglutininas vermelhas numa suspensão verde. Com as restantes espécies de *Candida* não se observa essa reacção de aglutinação. Se a espécie não for *C. albicans* ou *C. dublinienses*, não se verifica aglutinação, a suspensão mantém uma cor castanha homogénea.

Todos os isolados incluídos neste trabalho que não aglutinaram neste teste, nem formaram tubos germinativos no teste anterior, foram considerados como sendo espécies não-*albicans* e foram posteriormente identificados através de testes fisiológicos (ID 32 C<sup>®</sup>).

## **2.4. Caracterização Fisiológica e Bioquímica**

### **2.4.1 VITEK<sup>®</sup> (BioMérieux)**

Utilizou-se o sistema comercial padronizado VITEK<sup>®</sup> para a identificação dos isolados clínicos incluídos neste estudo.

A carta de identificação (figura 3) de leveduras (YST) foi concebida para ser utilizada com o sistema VITEK<sup>®</sup>, para a identificação das leveduras mais frequentemente isoladas.



**Figura 3:** Cartas de identificação de leveduras patogénicas do sistema automatizado VITEK® (BIOMERIEUX).

#### Preparação das amostras:

A levedura a identificar deve provir de uma cultura pura com 18 horas no mínimo e não mais de 48 horas. Esta deve ser efectuada no meio de gelose apropriado como o meio de gelose Sabouraud dextrose.

Semeia-se a amostra no meio de gelose apropriado e incuba-se a 30°C. Após a cultura obtida, retira-se a carta YST da embalagem e identifica-se o tubo com o código de barras correspondente ao número da cultura a identificar.

#### Preparação do inóculo:

O inóculo é preparado com uma concentração entre 1,8 a 2,5 da escala de *McFarland*. Para tal, adiciona-se 3ml de solução salina estéril a um tubo VITEK® e com uma ansa esterilizada, repicam-se colónias isoladas do meio sólido. Emulsiona-se um pouco da colónia da levedura na solução alcalina com um movimento circular e homogeneiza-se a suspensão no vórtex. A turvação da suspensão é ajustada no colorímetro VITEK®.

Inoculação da carta de identificação:

Insere-se o tubo de transferência da carta VITEK<sup>®</sup> no tubo, de modo a ficar completamente imerso. Coloca-se a carta na câmara de enchimento e pressiona-se em *Iniciar enchimento*. Aguarda-se a indicação sonora do aparelho, indicadora que o processo de enchimento está terminado. Retira-se o módulo, verifica-se se o enchimento da carta foi correctamente efectuado e por fim transfere-se o módulo para a câmara de leitura/incubação das cartas VITEK<sup>®</sup>.

Leitura/Incubação de resultados:

O Leitor/Incubador guarda as cartas de teste cheias com amostras num ambiente de temperatura controlada e lê as cartas de hora a hora por meio de sensores fotométricos. O Leitor/Incubador detecta as alterações na cor e turvação indicando depois esses dados no computador que transmite automaticamente os resultados finais dos testes de cada carta.

### **3. CANDIFAST**

O Kit CANDIFAST (figura 4) permite identificar as principais leveduras patogénicas para o ser humano e testar a respectiva resistência a alguns agentes antifúngicos.

A identificação de leveduras baseia-se em três princípios fundamentais: sensibilidade ou não da estirpe à actidiona, detecção da capacidade fermentativa de sete açúcares observada por meio da acidificação do meio e na demonstração da actividade urease.

A sensibilidade ou não da estirpe à actidiona é visualizada pela passagem do indicador corante para amarelo/amarelo-alaranjado ou fúcsia. A fermentação dos açúcares é visualizada pela passagem do indicador para a amarelo/amarelo-alaranjado, devido à

mudança de cor do indicador. Por último, a actividade da urease é demonstrada pela alcalinização do meio que faz passar o indicador para cor fúcsia.

A determinação da resistência das leveduras aos antifúngicos baseia-se no crescimento das leveduras, ou na sua ausência, na presença de alguns antifúngicos. Este crescimento é visualizado através de uma alteração da cor do meio. Esta alteração deve-se à fermentação da glicose pelas leveduras, o que corresponde a uma acidificação do meio e o vermelho de fenol presente que se torna amarelo/amarelo-alaranjado. A hidrólise da ureia pelas leveduras urease-positivas liberta amónia que alcaliniza o meio e o vermelho de fenol altera-se para rosa fúcsia.



**Figura 4:** Representação das galerias de identificação CANDIFAST<sup>®</sup>.

Este sistema consiste em galerias com 20 poços prontos a utilizar. Cada galeria permite testar uma amostra (identificação e teste de resistência). Na tabela 5 estão descritos os açúcares utilizados no teste de identificação e os diferentes antifúngicos utilizados no teste de resistência.



**Tabela 5:** Representação dos açúcares e dos antifúngicos utilizados em cada teste.

<i>Identificação</i>		<i>Estudo da resistência</i>	
Poço	açúcar	poço	antifúngico
1	Controlo positivo (+)	1	Controlo positivo (+)
2	Glicose (GLU)	2	Anfotericina B (AB) – 4 µg/mL
3	Galactose (GAL)	3	Nistatina (NY) – 200 unidades/mL
4	Trealose (TRE)	4	Flucitosina (FCT) – 35 µg/mL
5	Maltose (MAL)	5	Econazol (EC) – 16 µg/mL
6	Celobiose (CEL)	6	Ketoconazol (KTZ) - 16 µg/mL
7	Rafinose (RAF)	7	Miconazol (MCZ) - 16 µg/mL
8	Lactose (LAC)	8	Fluconazol (FCZ) - 16 µg/mL
9	vazio	9	vazio
10	vazio	10	vazio

### 3.1. Preparação do Inóculo

Com a ajuda de uma ansa ou de uma pipeta Pasteur, procede-se à colheita de uma colónia isolada. Em seguida, inocula-se a levedura num frasco de reagente e homogeneiza-se bem a suspensão.

A padronização do inóculo é feita relativamente ao frasco CT de controlo de turvação. Ajusta-se a opacidade do reagente 1 inoculado de acordo com a turvação do frasco CT, com a ajuda das linhas pretas existentes na etiqueta do frasco. Caso o reagente 1 seja mais turvo, procede-se à re-inoculação do frasco até se obter uma opacidade semelhante à do frasco CT. Se o reagente 1 se apresentar mais turvo, procede-se à sua diluição com um frasco de reagente 1 aberto de novo, até se conseguir a opacidade correcta.

### **3.2. Inoculação das galerias CANDIFAST**

#### **3.2.1. Teste de identificação**

Identifica-se previamente a galeria em relação à amostra a testar. Retira-se o revestimento adesivo e, distribui-se em cada um dos 8 primeiros poços 100 µl de reagente 1 inoculado e padronizado e 2 gotas de óleo de parafina. Volta-se a tapar a série de poços com o revestimento adesivo.

#### **3.2.2. Teste de resistência**

Primeiro, procede-se à inoculação do reagente 2 com 100 µl de reagente 1 inoculado e padronizado. Depois, retira-se o revestimento adesivo e distribuiu-se em cada um dos 8 primeiros poços 100 µl de reagente 2 inoculado e padronizado e 2 gotas de óleo de parafina. Volta-se a tapar a série de poços com o revestimento adesivo.

A galeria é incubada a 37°C durante 24 horas e, caso seja necessário ou consoante o tipo de estirpe, a incubação deve ser prolongada até 48 horas ou mesmo até 72 horas.

### **3.3. Leitura e interpretação das galerias**

A leitura das galerias é feita apenas se se observar no poço de controlo (C+: poço 1 da série para teste de resistência), a passagem a amarelo/amarelo-alaranjado ou a fúcsia (para os géneros urease positiva).

### **3.4. Série de identificação**

Poço 1 (ACT): a reacção é positiva quando se observa uma mudança na cor do meio para amarelo/amarelo-alaranjado ou fúcsia. Uma reacção negativa traduz-se por uma inexistência de alteração de cor do substrato.

Poço 2 a 8 (GLU a RAF): a reacção é positiva quando, nos poços, se observa uma mudança de cor do meio para amarelo/amarelo-alaranjado ou fúcsia. Uma reacção negativa traduz-se por uma inexistência de alteração de cor do substrato.

A identificação da levedura é efectuada de acordo com os resultados obtidos com os diferentes compostos da galeria CANDIFAST e com a análise em paralelo das características morfológicas das colónias. Para a respectiva interpretação, deve ser consultada a seguinte tabela:

**Tabela 6:** Identificação das espécies de leveduras do género *Candida* através das galerias CANDIFAST.

<i>Levedura</i>	<i>ACT</i>	<i>GLU</i>	<i>GAL</i>	<i>TRE</i>	<i>MAL</i>	<i>CEL</i>	<i>RAF</i>	<i>LAC</i>
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	V	+	-	-	-
<i>Candida albicans</i> (var. <i>stellatoidea</i> )	+	+	-	V	+	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	V	+	-	+	-	-	-	-
<i>Candida kefyr</i>	+	+	+	-	-	-	V	+
<i>Candida krusei</i>	V	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida lusitanae</i>	-	+	+	+	V	+	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	+	+	-	V	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	+	+	+	+	-	-	-

### 3.5. Série para o teste de resistência

Poço 2 a 8 (AB a FCZ): uma mudança de cor do meio para amarelo/amarelo-alaranjado ou fúcsia, traduz a capacidade da estirpe para crescer na presença dessa concentração de antifúngico, indicando que é resistente ao mesmo. Pelo contrário, a cor vermelho-alaranjado do meio, indica que a estirpe foi inibida pelo antifúngico presente no poço.

## **4. ESTUDO DA SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS PELO MÉTODO DE KIRBY-BAUER**

### **4.1. O Método de difusão em disco**

#### **4.1.1. Preparação do meio de cultura**

O meio de Müller-Hinton é o meio de cultura indicado para o estudo da sensibilidade das leveduras aos antifúngicos. A adição de azul-de-metileno durante a confecção deste meio de cultura permite uma visualização melhor definida dos limites dos halos de inibição. De acordo com as indicações da norma M44-P do CLSI, são adicionados cerca de 0,5 µg/ml de azul de metileno, a cada placa de Müller-Hinton.

#### **4.1.2. Preparação do Inóculo**

O inóculo é preparado retirando algumas colónias e dissolvendo-as em 500 µl de água destilada esterilizada ou soro fisiológico esterilizado, até apresentar uma turvação de 0,5 na escala de MaFarland, permitindo assim obter em suspensão cerca de 1 a  $5 \times 10^6$  células/ml.

#### **4.1.3. Inoculação das placas**

Para a inoculação das placas, o meio de cultura de Müller-Hinton agar suplementado com 2% de glucose e 0,5 µg/ml de azul de metileno, deve estar à temperatura ambiente e com a superfície seca. Em seguida, uma zaragatoa esterilizada é imersa na suspensão e, sob pressão, rodada contra as paredes do tudo acima do nível do líquido para retirar o excesso de inóculo. Com a mesma zaragatoa humedecida, inocula-se com estrias apertadas, toda a superfície do meio, em três direcções diferentes, tendo o cuidado de não rasgar o meio de cultura.

#### **4.1.4. Aplicação dos discos de antifúngico**

Para permitir a absorção de toda a suspensão pelo meio de cultura, deve-se esperar 5 minutos antes da aplicação dos discos com o antifúngico. Neste trabalho, foram utilizados discos impregnados com Fluconazol e com Voriconazol (Becton Dickinson, Sparks, Md.), e foram aplicados na superfície do meio de cultura (um disco por placa), com o auxílio de uma pinça esterilizada. Depois, foi tomado o cuidado de pressionar ligeiramente o disco contra o meio de cultura, para assegurar o contacto completo deste com a superfície do meio, e evitar a formação de bolhas de ar. As placas de Petri inoculadas e com os discos aplicados foram por fim incubadas a 30°C, durante 48 horas.

#### **4.1.5. Leitura das placas**

Após o período de incubação recomendado pelo fabricante, as placas foram observadas e verificou-se se o crescimento era confluyente e se as zonas de inibição estavam uniformemente circulares.

O diâmetro dos halos de inibição e as concentrações mínimas inibitórias (CMI) foram determinadas e registadas por um aparelho informático com o apoio do aparelho BIOMIC Expert-System (Giles Scientific Inc., Santa Barbara, EUA).

#### **4.1.6. Interpretação dos Resultados**

Os critérios de interpretação dos halos de inibição e respectivas CMIs que permitem diferenciar os níveis de sensibilidade ao fluconazol e voriconazol, estão descritos na tabela 7.

**Tabela 7:** Critérios de interpretação dos halos de inibição e concentrações mínimas inibitórias (CMI) para o fluconazol e voriconazol.

<i>Antifúngico</i>	<i>Concentração de fármaco no disco (µg)</i>	<i>Diâmetro do halo de inibição (mm)</i>			<i>CMI equivalente (µg/ml)</i>		
		<b>R</b>	<b>SDD</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>SDD</b>	<b>S</b>
<b>Fluconazol</b>	25	≤ 14	15-18	≥ 19	≤ 8	16-32	≥ 64
<b>Voriconazol</b>	2	≤ 13	14-16	≥ 17	≤ 1	2	≥ 4

**Sensível (S):** a infecção por uma estirpe desta categoria pode ser apropriadamente tratada com a dose de agente antimicrobiano recomendada.

**Sensível dependendo da dose (SDD):** estirpes para as quais a sensibilidade depende de se atingir a concentração sistêmica máxima possível de antifúngico.

**Resistentes (R):** estirpes que não são inibidas pelas concentrações sistêmicas que se obtêm após a dose normal do agente antimicrobiano.

De acordo com a norma M44-P do CLSI, quando as CMIs se encontram no limiar entre duas categorias, a sensibilidade do isolado deverá ser classificada na categoria superior.

## **5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS POR RFLP DA REGIÃO ITS DO rDNA**

### **5.1. Isolados Estudados**

Foram incluídos neste estudo os 100 isolados clínicos de leveduras obtidas a partir de amostras clínicas enviadas para o Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira E.P.E.

Foram também utilizados como estirpes padrão, isolados clínicos de leveduras obtidas em estudos realizados anteriormente no Laboratório de Micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, obtidos a partir de diferentes amostras biológicas.

### **5.2. Extração de DNA de fungos leveduriformes pelo método das microesferas**

A extração de DNA proveniente da cultura de cada isolado clínico foi executada utilizando o método das microesferas. A lise química provocada pelo tampão de lise associada à lise mecânica provocada pelas microesferas, permitem a eluição de moléculas de DNA.

Os diferentes passos de centrifugação separaram os resíduos presentes na amostra.

Num tubo Eppendorf (1,5 ml) contendo um volume de esferas de vidro (0,4-0,6 mm de diâmetro) equivalente a 200 µl adiciona-se 500 µl de Tampão de Lise (Tris 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM, SDS 0,3% (p/v, pH 8).

Em seguida é feita uma suspensão celular muito densa, seguida de forte agitação no vórtex durante 5 minutos. Coloca-se num banho a 65°C durante uma hora de modo a permitir a lise química das células. A suspensão é novamente agitada no vórtex durante 5 minutos

para permitir a lise mecânica e centrifugada durante 10 minutos a 11 000g, numa centrifuga de bancada *Heraeus Biofuge* para separação dos debrís celulares. Por último, recupera-se o sobrenadante que contém o DNA para um novo tubo e guarda-se a -20C. Nestas condições o DNA mantém-se em bom estado por um período superior a um ano.

### 5.3. Preparação do DNA para PCR

Para utilizar o DNA numa reacção de PCR é necessário fazer uma diluição de 1:750 em tampão Tris-HCL da extracção de DNA anteriormente descrita: num tubo Eppendorf 1,5 ml pipeta-se 1500 µl água (Braun®) e adiciona-se 2 µl de DNA, ficando assim o DNA pronto a ser utilizado numa reacção de PCR ou conservado durante alguns meses a -20C.

### 5.4. Amplificação da região ITS do rDNA

A amplificação da região ITS do DNA ribossómico é feita utilizando a técnica de PCR, utilizando *primers* específicos. Podem ser utilizados diferentes *primers* para amplificar esta região, mas neste estudo foram utilizados os primers universais ITS1 e ITS4. A sequência dos *primers* utilizados está descrita na tabela 8.

**Tabela 8:** Sequência oligonucleotídica dos *primers* ITS1 e ITS4.

<i>primer</i>	<i>Sequência</i>
ITS1 ( <i>forward</i> )	5'-TCC GTA GAA CGT GCG G-3'
ITS4 ( <i>reverse</i> )	5'-TCG TCG GCT TAT TGA TAT GC-3



A mistura reaccional da reacção de PCR para a amplificação da região ITS (regiões ITS1 e ITS2 e subunidade 5,8S) do rDNA de cada amostra está esquematizada na tabela 9:

**Tabela 9:** Mistura reaccional usada nas reacções de PCR para amplificação da região ITS do DNA ribossómico de isolados clínicos do género *Candida*.

<i>Solução stock</i>	<i>Concentração final</i>	<i>Volume por tubo (µl)</i>
Água destilada Braun		12
Tampão 10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub> 25mM	3,5 mM	2,0
dNTPs 1,25mM cada	250 µl cada	2,5
Primers 5 µM	0,8 µM cada	0,8
Taq polymerase	1U	0,2
DNA 1:750	1:1750	5,0

A reacção de PCR começa com desnaturação do DNA para permitir a ligação dos *primers* à cadeia de DNA alvo. Para tal, a mistura reaccional é submetida a uma temperatura de 95°C durante 5 minutos num termociclador Tpersonal Combi (Biometra), seguida de mais 45 segundos à 94°C. A hibridação dos *primers* é feita a 54°C durante 30 segundos, seguida da extensão a 72°C durante 1 minuto, repetindo-se este processo durante 40 ciclos. A extensão final ocorre a 72°C durante 5 minutos (tabela 10).

**Tabela 10:** Programa de PCR utilizado na amplificação da região ITS do rDNA dos isolados clínicos de leveduras do género *Candida*.

		<i>x40 ciclos</i>			
Temperatura	Desnaturação inicial	Desnaturação	Hidribação dos primers	extensão	Extensão final
	95°C	94°C	54°C	72°C	72°C
Tempo	5 minutos	45 segundos	30 segundos	1 minuto	5 minutos

### 5.5. Detecção dos produtos amplificados

Os produtos amplificados são detectados por electroforese em gel de agarose e corados com *Gel Red*, por incorporação do corante.

O gel de agarose é preparado de forma a obter um gel com 1% de agarose e um volume volume de 100 ml. A sua composição está esquematizada na seguinte tabela (tabela 11):

**Tabela 11:** Composição do gel de agarose para visualização dos produtos de amplificação da região ITS dos isolados clínicos de leveduras do género *Candida*.

<i>Gel de agarose a 1%</i>	
Agarose	1,50 g
TBE 10%	100 ml
<i>Gel Red</i>	10 µl

O gel é preparado num Erlenmeyer, dissolvendo a agarose em TBE 0,5x, por aquecimento até a mistura ficar homogênea e não se visualizarem grânulos de agarose. Adiciona-se o *Gel Red* à agarose já cozida e, antes de polimerizada, verte-se a agarose sobre o suporte com o pente previamente colocado. Deixa-se então solidificar o gel através da polimerização da agarose. Para acelerar a polimerização pode-se colocar o suporte com a agarose à temperatura de 4°C. Depois de polimerizado, o gel é colocado na tina de electroforese previamente cheia com tampão TBE 0,5x (1,0mM Tris; 0,9mM ácido bórico; 0,01 mM EDTA, pH 8).

Adiciona-se 2 µl de tampão de carga do gel (azul de bromofenol) a 8 µl da amostra e a mistura é aplicada no gel. Aplica-se também o marcador de peso molecular (Gene Ruler DNA 100 pb - Invitrogen), dissolvido no mesmo tampão de carga. Inicia-se a corrida aplicando uma voltagem de 100V, durante 40 minutos, à temperatura ambiente.

As bandas são visualizadas num transiluminador de luz UV e as imagens são captadas e digitalizadas com o sistema Eagle Eye Still Vídeo System – Statagene.

## **6. RFLP DA REGIÃO ITS DO rDNA**

As enzimas de restrição, também conhecidas como endonucleases de restrição, reconhece m sequências específicas de DNA, cortando-o nesses locais. Clivam a dupla cadeia de DNA (dsDNA) em locais específicos ou adjacentes à sequência de reconhecimento. A maioria das enzimas de restrição não corta DNA metilado, em uma ou em ambas as vertentes do seu local de reconhecimento, embora algumas exijam um substrato de metilação.

Cada enzima de restrição tem requisitos específicos para uma acção óptima. As condições de armazenamento e de ensaio favorecem uma maior actividade e maior especificidade na função de uma enzima em particular. Condições tais como a temperatura, o pH, a necessidade de cofactores, a composição de sal e a força iónica, são alguns dos requisitos que podem afectar a actividade da enzima e a sua estabilidade.

Neste trabalho foi utilizada a enzima de restrição *MspI* cuja sequência de corte está descrita na seguinte tabela 12.

**Tabela 12:** Sequência de corte identificada pela enzima de restrição *MspI* e região de corte (seta a vermelho).

<i>Enzima</i>	<i>Sequência</i>
<i>MspI</i>	C↓CG G
	G GC↑C

Tendo o cuidado de colocar previamente os tubos no gelo, prepara-se a mistura reaccional pipetando, para cada amostra, os reagentes e quantidades apresentadas na tabela 13.

**Tabela 13:** Mistura reaccional usada em cada reacção de restrição com a enzima *MspI* para a identificação de isolados clínicos do género *Candida*.

<i>Solução stock</i>	<i>Volume por tubo (µl)</i>
Água destilada (Braun®)	16,3
Tampão RE 10x	2,0
Tampão BSA acetilado, 10µg/µl	2,0
Enzima <i>MspI</i> , 10µg/µl	0,5
DNA 1µg/µl	1,0

A mistura reaccional é incubada a uma temperatura óptima de actuação a qual é sempre indicada pelo fabricante. No caso da enzima *MspI*, e seguindo as instruções do fabricante, a temperatura óptima de actividade é de 37°C e a reacção decorreu no espaço de 2 horas.

### 6.1. Detecção dos fragmentos de restrição

Os produtos de restrição são detectados por electroforese em gel de agarose e coloração por incorporação de *Gel Red*, tal como já foi exposto anteriormente (página 50).

O gel de agarose usado para visualização das reacções de restrição realizadas neste trabalho, foi preparado de acordo com a composição descrita na tabela 14.

**Tabela 14:** Composição do gel de agarose para visualização dos produtos de restrição com a enzima *MspI* para a identificação de isolados clínicos do género *Candida*.

<i>Gel de agarose a 2%</i>	
Agarose	1,0 g
TBE 10%	50 ml
<i>Gel Red</i>	6 µl

O gel é preparado num Erlenmeyer, dissolvendo a agarose em TBE (0,5x), por aquecimento até a mistura ficar homogénea e não se visualizarem grânulos de agarose. Adiciona-se o *Gel Red* à agarose depois de cozida e, antes da sua solidificação, verte-se a agarose sobre o suporte com o pente colocado e deixa-se polimerizar. Para acelerar a polimerização pode-se colocar o suporte com a agarose à temperatura de 4°C. Depois de polimerizado, o gel é colocado na tina de electroforese, previamente cheia com tampão TBE 0,5x (1,0mM Tris; 0,9mM ácido bórico; 0,01 mM EDTA, pH 8).

Adiciona-se 2 µl de tampão de carga do gel (azul de bromofenol) a 20 µl da amostra e a mistura é aplicada no gel. Aplica-se também o marcador de peso molecular (Gene Ruler DNA 100 pb - Invitrogen), dissolvido no mesmo tampão de carga. Inicia-se a corrida aplicando uma voltagem de 50V, durante 100 minutos, à temperatura ambiente.

As bandas são visualizadas num transiluminador de luz UV e as imagens são captadas e digitalizadas com o sistema Eagle Eye Still Vídeo System – Stratagene.

## PREVENÇÃO DE CONTAMINAÇÃO DAS AMOSTRAS

Durante todo o procedimento foram tomadas medidas para prevenir a contaminação das amostras (Bogard *et al.* 1998, Kwok *et al.* 1989).

- As diferentes fases do processamento decorreram em locais fisicamente separados.
- Preparação das amostras em câmara de fluxo laminar de modo a evitar qualquer tipo de contaminação.
- As luvas, pipetas, batas e outro material de laboratório são de uso exclusivo na sala onde se encontram, e não são usados em outras actividades ou em outras áreas.
- Cuidado em não se transferir qualquer elemento do local de detecção para zonas de pré-amplificação.
- As luvas descartáveis e batas são colocadas em cada área de trabalho e mudadas sempre que se entrar ou sair dessa área.
- As soluções usadas na PCR, sempre que as suas características não se alteram, são autoclavadas.
- Utilização de alíquotas dos reagentes.
- Deve-se evitar a formação de aerossóis e salpicos.
- O DNA deve ser sempre o último a ser transferido para os tubos de reacção.





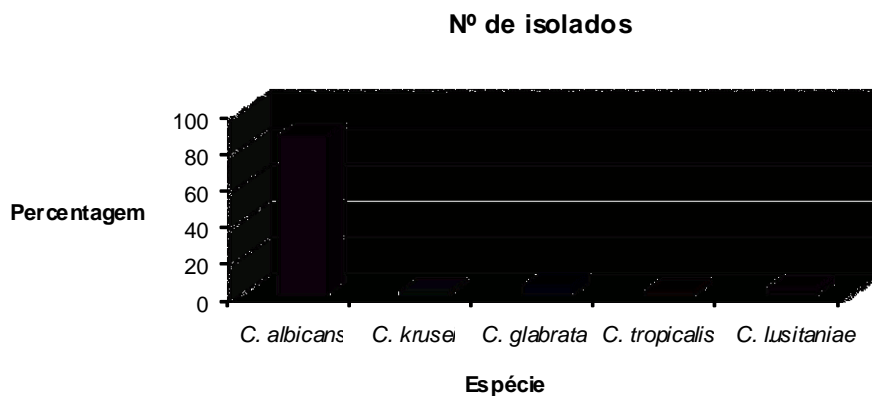
## ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida* sp. DO CENTRO HOSPITALAR COVA DA BEIRA, E.P.E.

A partir dos produtos enviados para o Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira E.P.E. foram estudados 100 isolados clínicos, previamente identificados pelo sistema VITEK: *C. albicans* (87 isolados), *C. tropicalis* (2 isolados), *C. krusei* (2 isolados), *C. glabrata* (5 isolados) e *C. lusitaniae* (4 isolados).

O número de isolados, bem como as respectivas percentagens face ao total de isolados desta espécie, estão descritos na tabela 15 e representados no gráfico 1.

**Tabela 15:** Percentagem de isolados de cada espécie.

<i>Espécie</i>	<i>Nº de isolados</i>	<i>Percentagem (%)</i>
<i>C. albicans</i>	87	87
<i>C. glabrata</i>	5	5
<i>C. lusitaniae</i>	4	4
<i>C. krusei</i>	2	2
<i>C. tropicalis</i>	2	2
	100	100



**Gráfico 1:** Percentagem de isolados de cada espécie.

Do ponto de vista taxonómico são conhecidas cerca de 200 espécies de leveduras do género *Candida*, das quais 10% podem causar infecções em seres humanos. Destas, *C. albicans* é a espécie que se encontra mais frequentemente descrita em casos de infecções humanas, incluindo infecções hospitalares. Entretanto, outras espécies como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* apresentam também elevadas prevalências em vários países (Bonassoli *et al.* 2005).

Dos 100 indivíduos observados, verifica-se que na sua maioria se trata de uma população idosa uma vez que 73 indivíduos compreendem idades superiores a 65 anos.

A levedura mais isolada neste estudo (tabela 15) pertence à espécie *C. albicans*, seguida de *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. krusei* e *C. tropicalis*.

Estudos realizados em outros países (Wingard *et al.* 1996, Rex *et al.* 1994, Pfaller *et al.* 1996) estão de acordo com os resultados obtidos, na medida em foram isolados as mesmas 4 espécies mais comuns na nossa população, exceptuando o facto de não se ter encontrado amostras clínicas infetadas por *C. parapsilosis*. Esta espécie é referida por numerosos autores como sendo uma das espécies mais prevalentes, a mais frequente depois de *C. albicans*, mas na verdade é que a população do Centro Hospitalar da Cova da Beira E.P.E. não apresenta infecções por esta espécie, pelo menos no período em que foram recolhidas as amostras para a realização deste trabalho.

Em relação à frequência de isolados clínicos, as percentagens obtidas neste estudo não corresponderam às mesmas descritas em estudos realizados anteriormente. Em outros estudos (Colombo *et al.* 2003, Godoy *et al.* 2003), as espécies mais prevalentes foram *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, ao contrário do que se verificou nesta população estudada, uma vez que a espécie *C. tropicalis* foi a espécie encontrada em menor frequência.

A espécie *C. albicans*, comensal do trato gastrointestinal, genital e cutâneo, é quase sempre transmitida de forma endógena, geralmente em pacientes que tenham recebido antibioterapia ou quimioterapia prévia.

Estudos realizados em Portugal, nomeadamente num estudo efectuado em doentes oncológicos, verifica-se que as espécies mais frequentemente encontradas são *C. albicans*, seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* (Sabino *et al.* 2009). Outro estudo realizado com base no diagnóstico laboratorial de micoses humanas (Carvalho *et al.* 2000) também se verifica que a espécie mais comum é *C. albicans*, seguida de *C. glabrata* e *C. tropicalis*, estando estes resultados mais em concordância com os resultados obtidos neste trabalho.

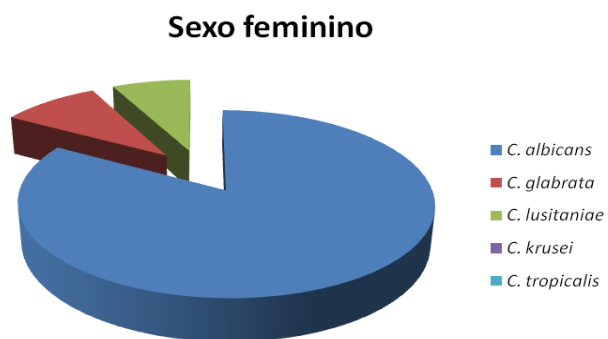
*C. parapsilosis* pode ser frequentemente encontrada na pele, sendo a sua transmissão predominantemente exógena. A sua taxa de ocorrência é elevada em crianças e em recém-nascidos prematuros internados em unidades de cuidados intensivos. Os factores de risco associados à sua transmissão são a nutrição parentérica e o uso prolongado de cateteres (Colombo *et al.* 2006)

Em relação ao sexo dos indivíduos estudados (tabela 16), como já foi referenciando anteriormente, o número de isolados obtidos a partir de indivíduos do sexo feminino (n=54) é superior ao número de isolados obtidos do sexo masculino (n=46). Ao analisar cada espécie, verifica-se que todas as estirpes de *C. glabrata* (n=5) e *C. lusitaniae* (n=4) foram isoladas a partir de doentes do sexo feminino (gráfico 2).

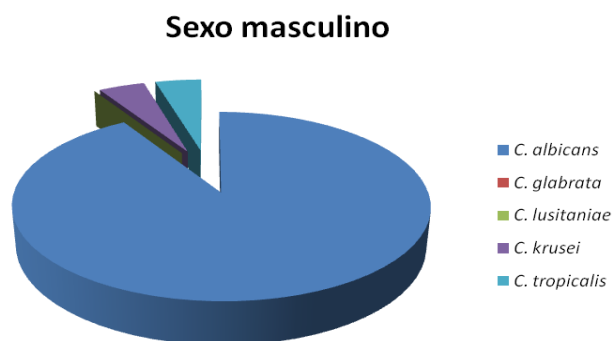
Por outro lado, os isolados de *C. krusei* (n=2) foram isolados do mesmo indivíduo pertencente ao sexo masculino. No caso da *C. tropicalis* (n=2), verificou-se uma situação idêntica, apesar de as estirpes serem provenientes de indivíduos diferentes (gráfico 3).

**Tabela 16:** Número de isolados de cada espécie, consoante o sexo.

<i>Espécie</i>	<i>Nº de isolados</i>	<i>Sexo feminino</i>	<i>Sexo masculino</i>
<i>C. albicans</i>	87	45	42
<i>C. glabrata</i>	5	5	0
<i>C. lusitaniae</i>	4	4	0
<i>C. krusei</i>	2	0	2
<i>C. tropicalis</i>	2	0	2
	100	54	46



**Gráfico 2:** Espécies das leveduras isoladas na população feminina.



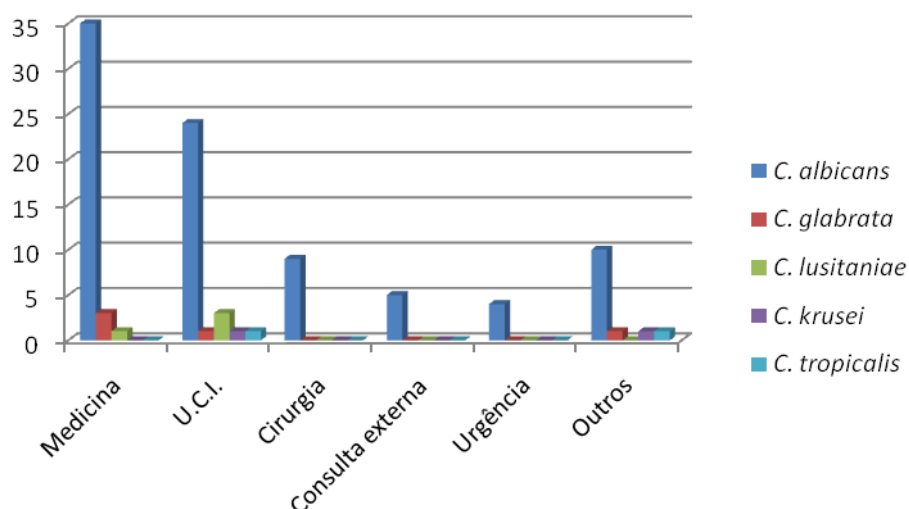
**Gráfico 3:** Espécies das leveduras isoladas na população masculina.

Em relação ao número de isolados relativos a cada Serviço hospitalar (tabela 17), é de salientar que pelo menos uma de cada, das culturas obtidas dos diferentes produtos biológicos, tem proveniência do serviço de Unidade de Cuidados Intensivos (U.C.I), num

total de 30 amostras. No entanto, foi a partir do serviço de Medicina onde se obteve o maior número (39 amostras) de isolados clínicos (gráfico 4).

**Tabela 17:** Número de isolados em cada espécie, consoante o Serviço hospitalar.

<i>Espécie</i>	<i>Medicina</i>	<i>U.C.I.</i>	<i>Cirurgia</i>	<i>Consulta externa</i>	<i>Urgência</i>	<i>Outros</i>
<i>C. albicans</i>	35	24	9	5	4	10
<i>C. glabrata</i>	3	1	0	0	0	1
<i>C. lusitaniae</i>	1	3	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	0	1	0	0	0	1
<i>C. tropicalis</i>	0	1	0	0	0	1
	39	30	9	5	4	13



**Gráfico 4:** Isolados de cada espécie referentes a cada Serviço hospitalar

Das 87 leveduras da espécie do género *C. albicans* estudadas neste trabalho, verifica-se que 35 isolados são provenientes do serviço de Medicina, seguido da U.C.I com 24 isolados clínicos, sendo os restantes isolados obtidos de doentes internados em diferentes serviços clínicos e doentes atendidos na Consulta externa e Serviço de Urgência. O mesmo se verifica em relação à espécie do género *C. glabrata*, onde a maioria dos isolados (n=3)

foram obtidos a partir de doentes internados no serviço de Medicina e apenas um doente na U.C.I. No caso da espécie *C. lusitaniae*, verifica-se, exactamente, o contrário, a maioria dos isolados (n=3) são obtidos a partir de doentes internados na U.C.I., sendo de salientar o facto de todos os isolados serem provenientes do mesmo doente, e apenas um isolado ser do Serviço de Medicina. Em relação às restantes espécies, tanto no caso da *C. krusei* como *C. tropicalis*, verifica-se que os isolados foram provenientes de doentes internados na U.C.I e em outros serviços clínicos de internamento.

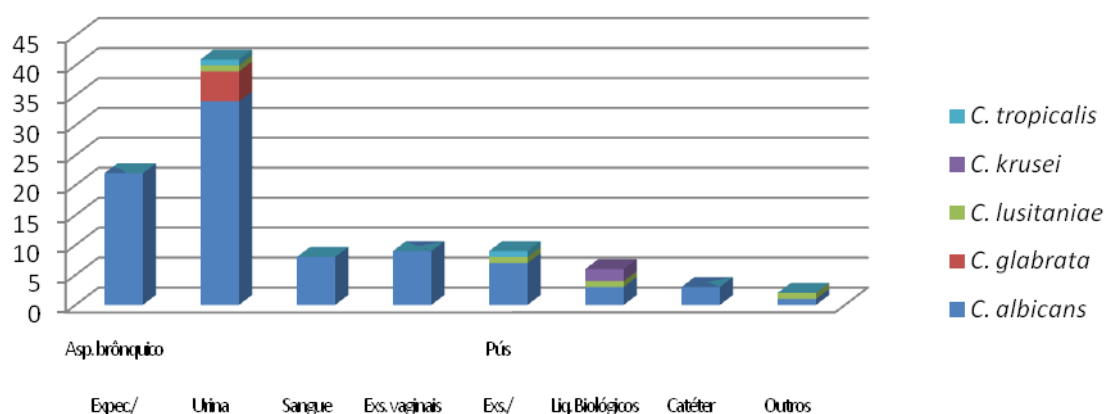
Este facto pode ser explicado devido ao número cada vez maior de infecções sistémicas causadas por espécies de leveduras anteriormente pouco comuns ou mesmo raras (Sidrim *et al.*, 2004) em consequência dos inúmeros factores que nas últimas décadas têm contribuído para esta alteração: aumento da população de risco (transplantes, neoplasias, corticoterapia, antibioterapia de largo espectro, SIDA) bem como o aumento dos regimes de imunodepressão por períodos cada vez mais longos.

Em relação ao número de isolados obtidos a partir de diferentes amostras clínicas (tabela 18), é de salientar que a partir de todas as amostras de expectoração/aspirado brônquico, hemoculturas, exsudados vaginais e catéteres isolou-se a espécie *C. albicans*. O produto biológico mais analisado neste trabalho foi urina (41 amostras), seguida das expectorações/aspirados brônquicos (n=22) e dos exsudados vaginais (n=9).

A espécie *C. glabrata* só foi isolada em amostras de urina, assim como a espécie *C. krusei* que só foi isolada a partir de amostras de líquidos biológicos (gráfico 5).

**Tabela 18:** Número de isolados em cada espécie obtidos a partir de diferentes amostras clínicas.

<i>Espécie</i>	<i>Expec./ Asp. brônquico</i>	<i>Urina</i>	<i>Sangue</i>	<i>Exs. vaginais</i>	<i>Exs./ Pús</i>	<i>Liq. Biológicos</i>	<i>Catéter</i>	<i>Outros</i>
<i>C. albicans</i>	22	34	8	9	7	3	3	1
<i>C. glabrata</i>	0	5	0	0	0	0	0	0
<i>C. lusitaniae</i>	0	1	0	0	1	1	0	1
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	0	2	0	0
<i>C. tropicalis</i>	0	1	0	0	1	0	0	0
	22	41	8	9	9	6	3	2



**Gráfico 5:** Número de isolados de cada espécie referentes a cada tipo de amostra clínica.

Em relação à espécie *C. lusitaniae*, verificou-se que os isolados foram obtidos a partir de 4 produtos biológicos diferentes, embora seja preciso ter em consideração que 3 destes isolados foram obtidos do mesmo doente, mas com origens de colheita diferentes. Por último, verificou-se que apenas foram obtidos isolados de *C. tropicalis* numa amostra de urina e numa amostra de exsudado/pus.

As leveduras do género *Candida* são as principais responsáveis pelas micoses urinárias, ocupando o 4<sup>a</sup> lugar nas infecções nosocomiais do tracto urinário no meio hospitalar. De acordo com a literatura, as espécies mais frequentemente encontradas são a *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

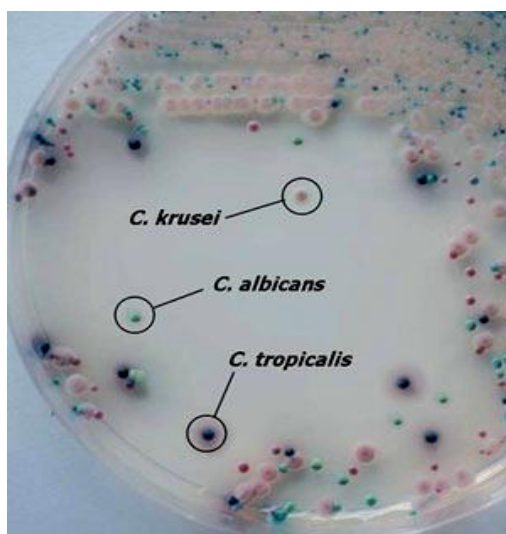
Em relação aos exsudados vaginais, e tal como seria de esperar, a espécie *C. albicans* foi a mais isolada, o que está igualmente de acordo com o descrito na literatura. No caso de amostras de sangue, uma única hemocultura positiva é indicação formal para terapêutica antifúngica agressiva.

Outros autores, tanto nos outros países da Europa como um pouco por todo o mundo têm descrito, nestes últimos anos, o aumento acentuado de casos de candidémia principalmente em doentes de Unidades de Cuidados Intensivos em virtude do aumento do número de factores de risco, como atrás foi referido, os quais envolvem principalmente a diminuição das defesas imunitárias dos doentes (Kauffman *et al.* 2000, Voss *et al.* 2000). Aliás, este problema de saúde pública tem, nas últimas décadas, aumentado substancialmente os casos de morbilidade e mortalidade a nível hospitalar e consequentemente, os gastos dos governos com os cuidados de saúde (Colombo *et al.* 2003, Colombo *et al.* 2006). Contudo, durante o período de recolha das amostras para a realização deste trabalho somente nos foi possível obter uma única amostra proveniente de uma hemocultura positiva para leveduras no Centro Hospitalar da Cova da Beira E.P.E. o que sugere a necessidade de uma maior sensibilização para esta realidade emergente e consequentemente, uma pesquisa mais acurada de novos casos bem como da optimização dos procedimentos laboratoriais no seu diagnóstico.



### Meio cromogénico CHROMagar *Candida*®

Na identificação de espécies do género *Candida* foi utilizado o meio cromogénico CHROMagar *Candida*®, no qual a identificação das diferentes espécies é feita através da observação da cor das colónias no meio de cultura (figura 5). No entanto, sabe-se que alguns isolados podem pertencer a espécies diferentes e apresentar a mesma cor de colónias, bem como numa mesma colónia a cultura pode ser mista, falseando a cor, o que limita muito a sua correcta identificação por este método. Para uma identificação definitiva das amostras, foram então feitas provas bioquímicas como fermentação e assimilação de hidratos de carbono, através da técnica automatizada VITEK® (Moreira *et al.* 2002, Hospenthal *et al.* 2006).



**Figura 5:** Representação do aspecto e da cor característica das colónias de cada espécie, identificadas pelo meio cromogénio CHROMagar *Candida*®.

Posteriormente, para todos os isolados incluídos neste trabalho foi efectuado o teste da blastese, e no caso de resultados não concordantes para *Candida albicans*, foi feito o teste de aglutinação Bichro-Latex Albicans® (Fumouze).

De acordo com outros trabalhos publicados (Hospenthal *et al.* 2006), nos últimos anos, têm sido comercializados diferentes meios de cultura cromogéneos com capacidade de diferenciar *Candida albicans* de outras leveduras com interesse clínico. Estes meios têm como fundamento a alteração na cor desenvolvida pelas colónias através de indicadores de pH e fermentação de substratos cromogéneos. A utilização do meio CHROMagar *Candida*<sup>®</sup>, facilita a detecção e a identificação de leveduras do género *Candida*, fornecendo resultados presuntivos em menos tempo que os obtidos pelos métodos já padronizados pois permite essa identificação directamente a partir da primocultura. Este meio mostra também ser útil na detecção de leveduras em amostras clínicas que contenham misturas de várias espécies do género *Candida*, cujo crescimento em meio de Sabouraud não permite esta diferenciação, embora para tal seja necessário que colónias distintas cresçam separadas e isoladas.

A utilização deste meio mostra, de acordo com este estudo, a sua capacidade de contribuir para um diagnóstico rápido das infecções causadas por leveduras do género *Candida*, tornando-se assim útil na identificação presuntiva de leveduras, principalmente em laboratórios onde o volume diário de amostras é muito elevado, como nos laboratórios de centros hospitalares.

### **Teste da blastese**

O teste da blastese foi considerado positivo nos casos em que se observou a formação de tubo germinativo, após 2,5 horas de incubação em soro humano (ou clara de ovo), a 37°C. Os resultados obtidos estão representados na tabela 24 (Anexo I).

Das 87 amostras identificadas como *Candida albicans* (87%), apenas com uma não se observou a formação de tubo germinativo ( $\approx 1,15\%$ ), ficando este resultado muito distante do que está descrito na literatura, que refere que cerca de 5% das leveduras *C. albicans* não formam tubo germinativo (Kwon-Chung & Bennett 1992). Esta amostra foi depois testada com o teste Bichro-Latex Albicans<sup>®</sup> (Fumouze), revelando um resultado positivo, sendo assim identificada como sendo *Candida albicans*.

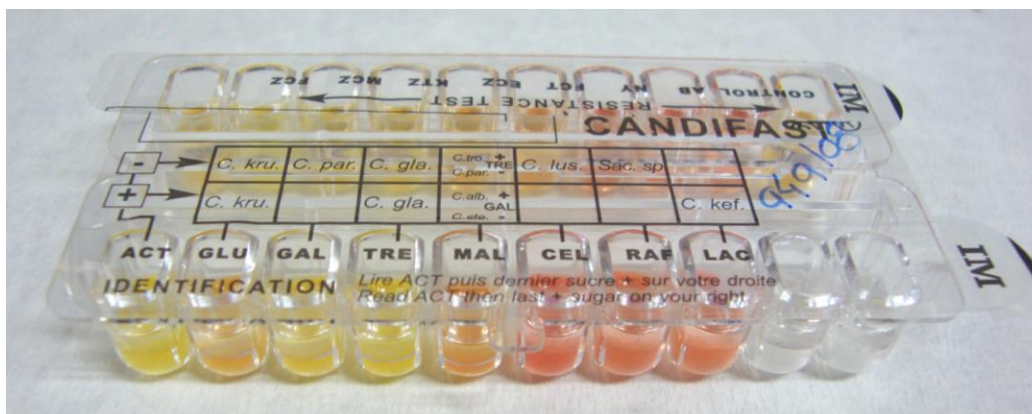
Apesar dos métodos tradicionais utilizados na identificação de leveduras do género *Candida* se revelarem simples de executar, é sempre necessário proceder à sua confirmação utilizando testes de identificação bioquímicos como o VITEK<sup>®</sup> que, no entanto, tem o inconveniente de retardar ainda mais a resposta. Como o tempo de resposta por parte do laboratório é um importante factor para a instituição de uma terapêutica eficaz, estes testes podem ser inadequados em casos em que se torna imprescindível dar uma resposta urgente, como o caso de doentes internados nas unidades de cuidados intensivos. Como tal, torna-se necessário implementar testes de diagnóstico mais rápidos e precisos para que o tratamento das micoses seja iniciado com maior brevidade possível.

## **CANDIFAST**

O Kit CANDIFAST permite identificar as principais leveduras patogénicas para o ser humano e testar a respectiva resistência a alguns agentes antifúngicos.

A pedido de um laboratório comercial foram estudados alguns isolados clínicos de diferentes espécies do género *Candida*, já previamente identificados, e observados se os resultados eram concordantes. Os testes do painel de identificação estão ilustrados na figura

6 e os do painel da determinação da resistência das leveduras a alguns dos antifúngicos utilizados no tratamento das infecções estão ilustrados na figura 7.



**Figura 6:** Painei CANDIFAST de identificação de levduras



**Figura 7:** Painei CANDIFAST de determinação da resistência das leveduras

Das 5 amostras testadas por este método, apenas 3 corresponderam ao perfil certo, tendo-se obtido um grau de identificação de 60%. Os resultados de identificação das leveduras obtidos estão representados na tabela 19.

**Tabela 19:** Representação dos resultados de identificação de leveduras obtidos no teste CANDIFAST.

<i>Identificação molecular</i>	<i>Identificação CANDIFAST</i>
<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. lusitaniae</i>

Em relação ao painel de determinação da resistência das leveduras à Anfotericina B, Nistatina, Flucitozina, Econazol, Ketoconazol, Miconazol e Fluconazol, das 5 amostras testadas para a determinação das resistências, apenas 2 não corresponderam ao perfil certo, obtendo-se um grau correcto de identificação de 60%. Os resultados de determinação da resistência das leveduras obtidos estão representados na tabela 20.

**Tabela 20:** Representação dos resultados de resistência de leveduras obtidos no teste CANDIFAST.

<i>Espécie</i>	<i>Fluconazol</i> <i>(método em disco)</i>	<i>Fluconazol</i> <i>(CANDIFAST)</i>
<i>C. albicans</i>	sensível	sensível
<i>C. glabrata</i>	sensível	sensível
<i>C. lusitaniae</i>	sensível	sensível
<i>C. krusei</i>	SDD	<b>resistente</b>
<i>C. tropicalis</i>	sensível	<b>resistente</b>
<i>C. parapsilosis</i>	sensível	sensível

(SDD- sensível dependendo da dose)

Através da análise dos resultados podemos observar que este sistema apresenta percentagens de identificação das leveduras (60%) inferiores às percentagens de outros sistemas, como o caso dos sistemas VITEK e ID32C da BioMerieux, que apresentam percentagens de identificação na ordem dos 90%. Como tal, este novo teste não reflecte um bom desempenho quer na identificação, quer na determinação da sensibilidade a alguns antifúngicos, não permitindo assim ter total confiança nos resultados obtidos com ele.

Para além disso, é um teste que, apesar do número reduzido de testes efectuados, apresentou logo algumas limitações. Com as estirpes de *C. lusitaniae* observou-se um atraso no crescimento na presença de trealose (poço TRE) tornando difícil a sua identificação. No caso da identificação do isolado de *C. glabrata* observou-se igualmente um atraso no crescimento em galactose (poço GAL) o que veio dificultar também a leitura dos resultados. Por último, foi também obtido um resultado ambíguo em um dos casos, pois deu origem a dois resultados possíveis como se pode verificar na tabela 19. Posteriormente a identificação desse isolado foi confirmada por outras metodologias e verificou-se que se tratava unicamente de uma só espécie (*C. tropicalis*).

Apesar deste teste em galeria ser um teste simples de executar, foi demorado na sua resposta, na medida em que necessitou inclusivamente de 72 horas para se obter resultados. E, como já foi dito anteriormente, como o tempo de resposta por parte do laboratório é um importante factor para a instituição da terapêutica, por isso estes testes podem ser inadequados nos casos em que se torna urgente dar uma resposta rápida.

### Teste de sensibilidade aos antifúngicos

Para todas as 100 amostras incluídas neste trabalho foi estudada a sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos fluconazol e voriconazol, pelo método da difusão em disco, de acordo com a norma M44-P do CLSI (NCCLS, 2003).

Os resultados obtidos no teste de sensibilidade ao Fluconazol e Voriconazol, para cada um dos isolados, estão descritos na tabela 25, (anexo II).

Os estudos de sensibilidade aos antifúngicos são extremamente importantes, uma vez que permitem otimizar decisões clínicas sobre a terapêutica mais adequada a cada indivíduo. Em relação aos antifúngicos utilizados neste trabalho, foram detectadas resistências a ambos os antifúngicos, ao contrário de outro trabalho (Carvalho, 2008) em que apenas se verificou resistência ao fluconazol.

O número de isolados resistentes, bem como as percentagens em relação ao total de isolados de cada espécie estão descritos nas tabelas 21 e 22.

**Tabela 21:** Percentagem de isolados sensíveis e resistentes ao Fluconazol, para cada espécie.

<i>Espécie</i>	<i>Nº de isolados resistentes</i>	<i>Resistente</i>	<i>Sensível</i>
<i>C. albicans</i>	1	1,15%	98,85%
<i>C. glabrata</i>	0	0%	100%
<i>C. lusitaniae</i>	0	0%	100%
<i>C. krusei</i>	0	0%	100%
<i>C. tropicalis</i>	0	0%	100%

**Tabela 22:** Percentagem de isolados sensíveis e resistentes ao Voriconazol, para cada espécie.

<i>Espécie</i>	<i>Nº de isolados resistentes</i>	<i>Resistente</i>	<i>Sensível</i>
<i>C. albicans</i>	2	2,30%	97,70%
<i>C. glabrata</i>	0	0%	100%
<i>C. lusitaniae</i>	0	0%	100%
<i>C. krusei</i>	0	0%	100%
<i>C. tropicalis</i>	0	0%	100%

Através da análise dos resultados podemos observar relativamente, ao Fluconazol, que apenas um dos isolados clínicos apresentou resistência. Este isolado é uma levedura de *C. albicans*, ao contrário daquilo de que seria de esperar, pois de acordo com a literatura, deveria ser esperados mais casos de resistência, nomeadamente nos isolados clínicos de *C. krusei*, uma vez que esta espécie é naturalmente resistente a este antifúngico. No entanto, este facto pode ser devido à utilização frequente e prolongada de Fluconazol, para o tratamento de candidose, ou pode também ter sido devido à utilização de um inóculo muito denso na realização deste teste, que acabou por interferir no seu resultado. Por outro lado, e como se trata de uma doente internada, este tipo de infecção pode estar relacionado com o uso de sondas ou de cateteres e, nestes casos, o tratamento com Fluconazol é mais prolongado. Como tal, nestes casos, o tratamento com Anfotericina B é recomendado quando não há resposta clínica/laboratorial favorável ao Fluconazol.

Em relação ao Voriconazol, podemos observar que dois isolados de *C. albicans* apresentaram resistência a este antifúngico, sendo que um deles também apresentou resistência ao Fluconazol. Foram descritas algumas resistências noutros trabalhos, nomeadamente sensibilidade diminuída *in vitro* para algumas espécies de *C. krusei* e *C. glabrata*, os resultados *in vitro* podem não ter grande correlação com os resultados *in vivo*,



dando origem a um impacto clínico mais limitado. Portanto, o voriconazol tem apresentado grande sucesso clínico para o tratamento de candidemia. Apesar de terem sido descritas estas resistências ao Fluconazol e Voriconazol, a grande maioria dos isolados não apresentou qualquer tipo de resistência.

É importante destacar que numa decisão terapêutica adequada para cada doente se deve considerar não só o microrganismo patogénico, como também as características intrínsecas do paciente. É necessária uma vigilância periódica da susceptibilidade das leveduras do género *Candida* ao Fluconazol, já que tem sido cada vez mais utilizado. Devem ser realizados mais estudos epidemiológicos em doentes infectados com leveduras do género *Candida*, tendo em consideração o seu estado de saúde e a sua história clínica. A padronização de metodologias para permitir o conhecimento da susceptibilidade dos isolados clínicos pode contribuir para a instituição atempada da terapêutica mais adequada para o controle da infecção (Bodey *et al.* 2002)

## **Métodos moleculares para o diagnóstico e identificação de leveduras do género *Candida***

As amostras submetidas à identificação por técnicas moleculares neste trabalho foram as mesmas identificadas pelos métodos tradicionais. Na identificação molecular dos isolados clínicos, foi utilizada a técnica PCR-RFLP com enzima de restrição *MspI*, de acordo com o protocolo que foi descrito por *Mirhendi et al.* 2006. Este é um método simples de executar e que permite identificar correctamente e em pouco tempo, isolados clínicos a partir de culturas.

Após a optimização da técnica de PCR-RFLP, os resultados obtidos foram simples de interpretar, uma vez que cada espécie é caracterizada por um padrão de bandas específicas. Ao observar os resultados, podemos verificar que foram obtidas para todos os isolados estudados, as bandas características para cada espécie.

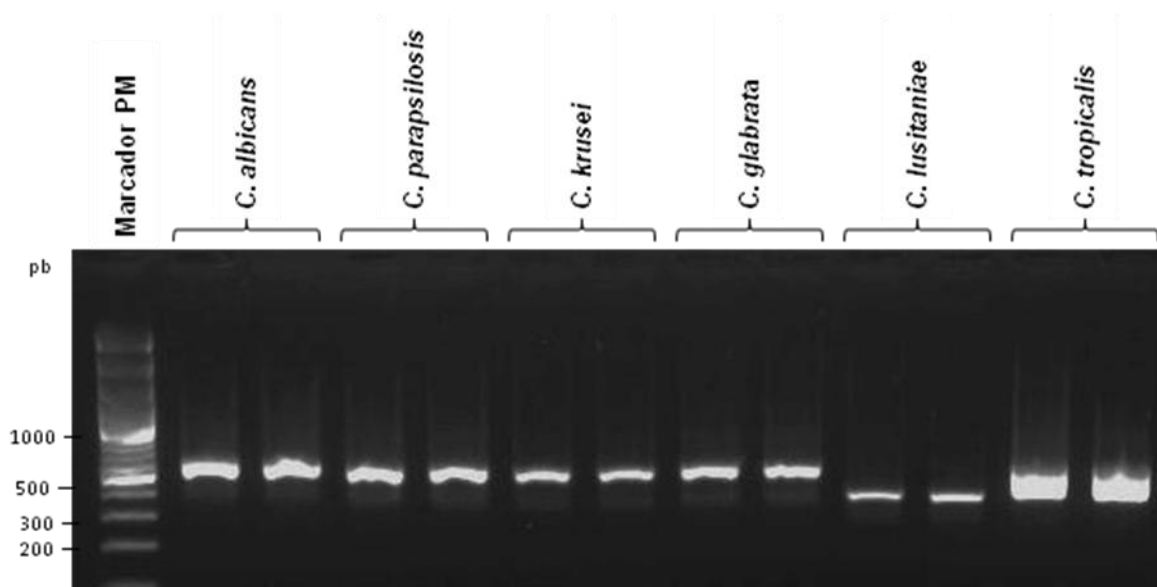
O tamanho dos produtos de PCR correspondentes às regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossómico, incluindo a sub-unidade genómica 5,8S, de cada uma das espécies estudadas e os respectivos tamanhos das bandas após restrição com a enzima *MspI* estão descritos na tabela 23.

Os resultados obtidos na identificação dos isolados provenientes de amostras clínicas incluídas neste estudo, através de métodos moleculares, bem como dos convencionais, estão descritos na tabela 26 (anexo III).

**Tabela 23:** Tamanhos das bandas da região ITS do DNA ribossômico de diferentes espécies do género *Candida* e tamanho das bandas após restrição com enzima *MspI*.

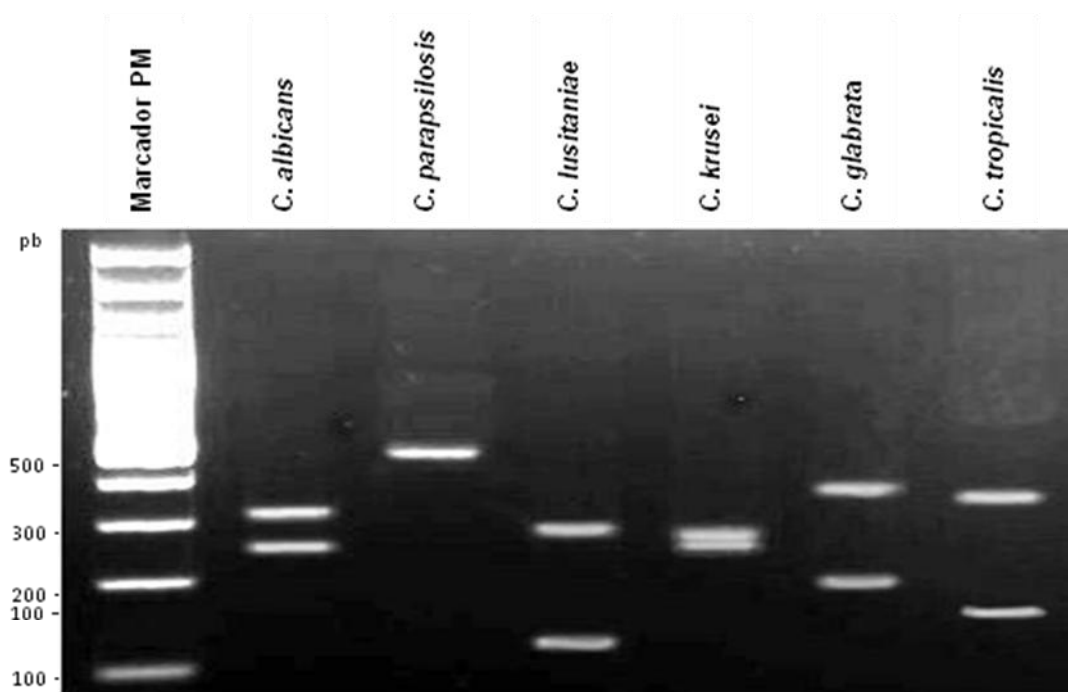
<i>Espécie</i>	<i>Região ITS (pares de bases)</i>	<i>Produtos de restrição (pares de bases)</i>
<i>C. albicans</i>	535	297, 238
<i>C. glabrata</i>	871	357, 214
<i>C. lusitaniae</i>	420	300, 140
<i>C. krusei</i>	510	261, 249
<i>C. tropicalis</i>	524	340, 184
<i>C. parapsilosis</i>	520	520

Na figura 8 está representada a imagem do gel obtido após a amplificação da região ITS das espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* de isolados clínicos testados neste trabalho.



**Figura 8:** Padrões electroforéticos obtidos após amplificação por PCR da região ITS do rDNA de 6 espécies do género *Candida*: *C. albicans* (posição 2 e 3), *C. parapsilosis* (posição 4 e 5), *C. krusei* (posição 6 e 7), *C. glabrata* (posição 8 e 9), *C. lusitaniae* (posição 10 e 11) e *C. tropicalis* (posição 12 e 13).

Na figura 9 está representada a imagen de um gel obtido após a restrição pela enzima de restrição *MspI* da região ITS anteriormente amplificada, de isolados clínicos testados neste trabalho pertencentes às espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*.



**Figura 9:** Produtos de PCR de 6 espécies do género *Candida* após restrição com enzima *MspI*: *C. albicans* (posição 2), *C. parapsilosis* (posição 3), *C. lusitaniae* (posição 4), *C. krusei* (posição 5), *C. glabrata* (posição 6) e *C. tropicalis* (posição 7).

A partir dos resultados obtidos pudemos observar que as amostras identificadas por métodos tradicionais foram confirmadas por métodos moleculares, apesar de nos isolados clínicos provenientes do Centro Hospitalar Cova da Beira não se ter verificado a existência de *C. parapsilosis*. De modo, a confirmar este facto, foi utilizado um isolado clínico desta espécie isolado no laboratório de Micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical proveniente de um isolado clínico proveniente de uma hemocultura positiva de um doente de Lisboa.

A identificação das 100 leveduras do género *Candida* pelo método PCR-RFLP com enzima de restrição *MspI* descrito por *Mirhendi et al.* 2006, neste trabalho, revelou ser um método muito simples, rápido de executar e com uma elevada reprodutibilidade, atributos importantes para que uma metodologia possa vir a ser implementada em laboratórios de diagnóstico.

Os primers ITS1 e ITS4 utilizados na amplificação da região ITS do rDNA amplificaram sem dificuldade e com elevada eficácia a região interna de transcrição ITS1 e ITS2 de todas as espécies do género *Candida* testadas neste trabalho, produzindo um produto de PCR caracterizado por uma banda aproximadamente entre os 510 e os 870 pares de bases (pb).

Outro aspecto vantajoso deste método consistiu na facilidade de interpretação dos resultados da reacção de restrição, uma vez que cada espécie é caracterizada por bandas específicas com dimensões suficientemente distintas das outras espécies, o que permite facilmente a sua distinção. O padrão produzido é completamente específico para cada espécie do género *Candida*, não dando azo a discrepâncias nos resultados.

No entanto, este método requer a necessidade da extracção prévia de DNA a partir de culturas puras obtidas a partir da sementeira das amostras biológicas, ao contrário de outros de outros métodos moleculares, em que não é necessário extrair DNA, como o caso de PCR *multiplex* (Carvalho *et al.* 2008).

De acordo com os resultados obtidos, a técnica de PCR-RFLP com enzima de restrição *MspI* demonstrou ser uma técnica sensível, uma vez que todos os isolados foram identificados e concordantes com os resultados dos métodos tradicionais, o que representa uma eficácia de 100%.



A identificação da espécie fúngica responsável por uma infecção constitui o principal objectivo da realização de um bom diagnóstico micológico. Tendo sempre presente que o diagnóstico deve englobar a confirmação laboratorial com exame cultural e identificação do microorganismo patogénico, este trabalho teve como objectivo a confirmação de metodologias que permitam a correcta identificação de isolados clínicos, tanto no que respeita à escolha da técnica mais adequada, como ao conhecimento das próprias características de cada espécie. Para tal, foram elaborados vários estudos que englobam quatro pontos essenciais:

Estudo epidemiológico de isolados clínicos obtidos no Laboratório de Microbiologia do centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E.

- a aquisição de conhecimentos que permitissem um correcto diagnóstico micológico das espécies de leveduras causadoras de infecções mucocutâneas e invasivas.
- a identificação molecular de candidoses mucocutâneas e invasivas através de uma metodologia molecular de diagnóstico rápida e eficaz, mas que fosse simples e fácil de implementar em laboratórios de diagnóstico microbiológico.
- a comparação da eficácia de métodos de identificação de leveduras do género *Candida* – métodos tradicionais fenotípicos vs métodos moleculares.
- comparação do efeito de dois antifúngicos mais utilizados em medicina no tratamento de candidoses (Fluconazol e Voriconazol), utilizando dois métodos diferentes (E-test e Método de Difusão em Disco) para a determinação da susceptibilidade ou da resistência dos isolados clínicos aos fármacos de acordo com a norma internacional M44-P do CLSI (NCCLS, 2003).
- avaliar a ocorrência das diferentes espécies do género *Candida* como agentes etiológicos de infecção fúngicas no Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E.

Relativamente às 100 amostras processadas para a pesquisa das diferentes espécies de leveduras do género *Candida*, foram identificadas, pelos métodos tradicionais, 87 isolados (87%) como sendo *C. albicans*, 5 isolados (5%) como *C. glabrata*, 4 isolados (4%) como *C. lusitaniae*, 2 isolados (2%) como *C. krusei* e 2 isolados (2%) como *C. tropicalis*. Como de esperar, a maioria das amostras foram obtidas a partir de urina, sendo *C. albicans* (87%) a espécie mais frequentemente isolada neste produto, seguida de *C. glabrata* (5%) e *C. tropicalis* (2%).

Entre os métodos tradicionais para a identificação de leveduras utilizou-se como primeira linha o meio cromogénico CHROMagar *Candida*<sup>®</sup>, no qual a identificação das diferentes espécies é feita através da observação da cor das colónias no meio de culturas. Este teste é relativamente rápido e fácil de executar, pelo que é muito utilizado em laboratórios de rotina pois facilita a detecção e a identificação de leveduras do género *Candida* directamente a partir da primocultura, fornecendo resultados presuntivos em menor tempo. Contudo, este teste apresenta algumas limitações, nomeadamente, alguns isolados podem pertencer a espécies diferentes e apresentar a mesma cor de colónias, o que limita muito a sua correcta identificação por este método.

Outro teste de primeira linha utilizado na identificação da espécie mais frequente, *C. albicans*, é o teste da blastese, um método rápido, fácil de interpretar e de baixo custo. Contudo, pode apresentar algumas limitações pois estudos efectuados indicam uma pequena percentagem de isolados de *C. albicans* que não formam tubo germinativo. Simultaneamente, espécies como *C. tropicalis* também podem pseudofilamentar, parecendo formar tubos germinativos após incubações prolongadas, dando origem a leituras falso positivas (Chaffin *et al.* 1998, Consolaro *et al.* 2005, Hammer, *et al.* 2000, Lo *et al.* 1997).



Das 87 amostras identificadas como *C. albicans*, apenas uma não formou tubo germinativo ( $\approx 1,15\%$ ), ficando este resultado muito distante do que está descrito na literatura, que refere que cerca de 5% das leveduras *C. albicans* não formam tubo germinativo (Kwon-Chung & Bennett 1992). Esta amostra foi depois testada com o teste Bichro-Latex Albicans<sup>®</sup> (Fumouze), revelando um resultado positivo, tendo sido assim identificada como sendo *Candida albicans*.

Como tal, a utilização do meio cromogénico CHROMagar Candida<sup>®</sup> e teste da blastese para identificação de leveduras do género *Candida* revelaram-se insuficientes, sendo posteriormente necessária a utilização de outros métodos de diagnóstico que permitissem identificar outras espécies. Nos laboratórios com grande volume de amostras diárias, como nos laboratórios hospitalares, a identificação fisiológica e bioquímica das leveduras pode ser automatizada, sendo que um dos equipamentos mais utilizados é o sistema VITEK<sup>®</sup>. Este sistema da Biomerieux executa em poucas horas testes de identificação e susceptibilidade aos antifúngicos de maior interesse clínico utilizando as cartas VITEK<sup>®</sup>, ou mais especificamente, cartas de leveduras YST<sup>®</sup>. Paralelamente a este sistema, foi também testado um novo kit experimental CANDIFAST para identificação de leveduras, baseado na sensibilidade ou não da estirpe à actidiona, fermentação de sete açúcares devido à acidificação do meio e na demonstração da actividade urease. Contudo, das 5 amostras identificadas, apenas 3 corresponderam ao perfil certo, tendo-se obtido um grau de identificação de 60%, ficando este valor distante de outros sistemas de identificação como o sistema ID 32C (84,7%) e o sistema VITEK<sup>®</sup>. O sistema automatizado permitiu identificar de forma correcta todos os isolados, o que reflecte um bom desempenho deste sistema de identificação, permitindo ter confiança nos resultados obtidos.

Com o objectivo de otimizar a identificação de leveduras por métodos moleculares mais rápidos e sensíveis, têm sido utilizadas técnicas moleculares que têm como base a metodologia de PCR. Na identificação molecular dos isolados clínicos deste trabalho, foi utilizada a técnica PCR-RFLP com enzima de restrição *MspI*, de acordo com o protocolo descrito por (Mirhendi *et al.* 2006). Este é um método simples de executar que permite identificar correctamente e em pouco tempo, isolados clínicos a partir de leveduras crescidas em cultura.

Após a optimização da técnica, de PCR-RFLP, os resultados obtidos foram simples de interpretar, uma vez que cada espécie é caracterizada por um padrão de bandas específicas. Ao observar os resultados, podemos verificar que foram obtidas para todos os isolados estudados, bandas características para cada espécie. De acordo com os resultados obtidos este técnica revelou ser extremamente sensível, e estar de acordo com os métodos convencionais.

Para além da correcta identificação da espécie dos fungos responsáveis por infecções, a sensibilidade aos antifúngicos é um dos factores primordiais para o sucesso terapêutico pois a administração de um antifúngico a um indivíduo portador de um fungo resistente a esse fármaco apenas irá estimular a resistência do fungo e prolongar a infecção no indivíduo, além de lhe produzir efeitos secundários mais graves (Carvalho *et al.* 2008).

Existem diferentes susceptibilidades aos antifúngicos consoante a espécie do fungo infectante, nomeadamente no que respeita a leveduras do género *Candida*. Podem-se distinguir essas diferentes susceptibilidades através do método de difusão em disco, que foi aplicado neste estudo, e que revelou ser um método simples, pouco dispendioso, preciso e fácil de executar.

Os isolados neste trabalho revelam, na sua maioria, elevada sensibilidade ao fluconazol pois apenas 1,1% das leveduras estudadas foram resistentes a este fármaco e 2,3% foram resistentes ao voriconazol. É de salientar que, por este método, nenhum dos isolados de *C. krusei* foi resistente ao fluconazol, tal como seria de esperar, uma vez que esta espécie possui uma resistência intrínseca ao fluconazol.

Os estudos epidemiológicos revelam-se de extrema importância, permitindo acompanhar as alterações na incidência de fungos patogénios ao longo do tempo e averiguar tendências passadas e actuais (Foster *et al.* 2005). Neste contexto foi iniciado um rastreio epidemiológico com os 100 isolados clínicos de leveduras obtidas a partir de amostras clínicas enviadas para o Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira E.P.E. para o diagnóstico de infecção fúngica durante um período de 8 meses, desde Novembro de 2008 até Junho de 2009. Deixamos em aberto, com este trabalho, a necessidade de vir a ser realizado mais tarde um estudo epidemiológico mais consistente em que fosse estudado um número mais significativo de amostras, da ordem das largas dezenas, provenientes de diferentes patologias e amostras clínicas, a fim se ser conhecida a ocorrência e distribuição de cada espécie nesta região geográfica.

Neste trabalho, dos 100 isolados clínicos observados verificou-se que levedura mais isolada pertence à espécie *C. albicans* (87%), seguida da *C. glabrata* (5%), *C. lusitaniae* (4%), *C. krusei* (4%) e *C. tropicalis* (2%). Estudos realizados em outros países (Wingard *et al.* 1995, Rex *et al.* 1994, Pfaller *et al.* 1996) estão de acordo com os resultados obtidos, na medida em foram isolados as 4 espécies mais comuns na nossa população, exceptuando o facto de, na nossa amostragem, não se ter encontrado amostras clínicas infectadas por *C. parapsilosis*.

Como reflexão global, tomei conhecimento ao longo deste estudo efectuado que uma eficiente e rápida identificação dos fungos clinicamente relevantes é uma tarefa fundamental nos laboratórios de patologia clínica. A identificação ao nível da espécie é importante para determinar a etiologia da doença, para detectar novos agentes da doença, para prever resistências intrínsecas a agentes antifúngicos e para detectar causas de infecções nosocomiais. Face ao exposto, os estudos epidemiológicos são de extrema importância, assim como o diagnóstico das infecções fúngicas.

O diagnóstico das infecções fúngicas continua a ser efectuado por métodos tradicionais, que avaliam características fisiológicas e bioquímicas dos elementos fúngicos, mas que apesar de serem eficazes são, na sua maioria, demoradas impedindo um início rápido e atempado da terapêutica. Como tal, os métodos moleculares podem constituir uma alternativa viável ao diagnóstico micológico, nomeadamente de leveduras do género *Candida*, como se pode comprovar pelos resultados obtidos neste trabalho.



1. ABI-SAID, D., ANAISSIE, E., UZUN, O., PINZCOWSKI, H., VARTIVARIAN, S. (1997). The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clinical Infectious Diseases* **24**: 1122-1128.
2. ANDRIOLE V.T. (1999) Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **44**: 151-162.
3. ALBUQUERQUE, E.M., AUGUSTO, K.L., FREIRE, C.C. (2005). Frequência e actividade enzimática de *Candida* spp. na cavidade oral de pacientes diabéticos do serviço de endocrinologia de um hospital em Fortaleza. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **43** (4): 241-244.
4. BADIEE, P., KORDBACHEH, P., ALBORZI, A., MALEKHOSEINI, S., ZEINI, F., MIHENDI, H., MAHMOODI, M. (2007). Prospective screening in liver transplant recipients by panfungal PCR-ELISA for early diagnosis of invasive fungal infections. *Liver Transplantation*, **13** (7): 1011-1016.
5. BAILLIE, G.S., DOUGLAS, L.J. (1998). Effect of Growth Rate on Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Antifungal Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **42** (8): 1900-1905.
6. BIALEK, R., IBRICEVIC, A.(2000). Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a Nested PCR assay. *Journal of Clin. Microbiol.*, **4** (8): 2940-2940.

7. BARNEST, A.J., KRCMERY, V. (2002). Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection* **50**: 243-260.
8. BOCCIA, S., POSTERARO, B., LA SORDA, M. (2002). Genotypic analysis by 27A DNA fingerprinting of *Candida albicans* strains isolated during an outbreak in a neonatal intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **23** (5): 281-284.
9. BODEY, G.P., ISSELL, B.F. (2002). The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* Fungemia in patients with cancer. *Journal of Hospital Infection*, **112**: 380-85.
10. BOGARD, M., LAMORIL, J. (1998). Biologie Moléculaire en Biologie Clinique. Éditions scientifiques et médicales Elsevier, France: 63-64.
11. BONASSOLI, L. A., BERTOLI, M., SVIDZINSKI, T. I. E. (2005). High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *Journal of Hospital Infection* **59**: 159–162.
12. BRAJTBURG, J., BOLARD, J. (2003) Carrier Effects on Biological Activity of Amphotericin B. *Clinical Microbiology Reviews.* **9** (4): 512-531.
13. BROWN A.J.P. (2003) Expression of Growth Form-Specific Factors during Morphogenesis in *Candida albicans*. *Journal of Clin. Microbiol.* **7**: 87-122.

14. BRUMER, E., CASTANEDA, E. (1993). Paracoccidioidomycosis: update. *Clinical Microbiology Reviews*. **6** (2): 89-117.
15. BURGESS D.S. (2000). Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Candida albicans* . *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **36**: 13-18.
16. CALDERONE, R.A., GEE S.F., JOLY S., SOLL D.R., MEIS J.F.G., VERWEIJ P.E., POLACHECK I., SULLIVAN D.J. AND COLEMAN D.C. (2002) Identification of Four Distinct Genotypes of *Candida dubliniensis* and Detection of Microevolution In Vitro and In Vivo. *Journal of Clin. Microbiol.* **40** (2): 556-574.
17. CARVALHO, A. S., COSTA-DE-OLIVEIRA, MARTINS, M.L., C. PINA-VAZ, A. G. RODRIGUES, LUDOVICO, P., RODRIGUES, F. (2008). Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Medical Mycology*. **45** (7): 619 – 627.
18. CARVALHO, E.E., (2008). Diagnóstico Laboratorial de Micoses Humanas – Métodos Convencionais vs Métodos Moleculares. Dissertação do I Mestrado em Ciências Biomédicas, IHMT, 118 pp.
19. CHERER, S., STEVENS, D.A. (1987). Application of DNA Typing Methods to Epidemiology and Taxonomy of *Candida* Species. *Journal of Clin. Microbiol.* **25**: 675-679.



20. CLARK, T., SLAVINSKI, S. A., MORGAN, J. (2004). Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infection in a community hospital. *Journal of Clin. Microbiol.* **42** (10): 4468-4472.
21. COLOMBO, A.L., NUCCI, M., SALOMÃO, R., BRANCHINI, M.I., RITCHMANN, R. (1999). High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **34**: 281-286.
22. COLOMBO, A.L. (2000). Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. *Braz. Journal Infect. Dis.* **4** (3): 113-118.
23. COLOMBO, A.L., GUIMARÃES, T. (2003). Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **36** (5): 599-607.
24. COLOMBO, A. L., NUCCI, M., PARK, B. J., NOUÉR, S. A., ARTHINGTON-SKAGGS, B., DA MATTA, D. A., WARNOCK, D., MORGAN, J. (2006). Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clin. Microbiol.* **44** (8): 2816–2823.
25. CONSOLARO, M. E.L., ALBERTONI, T.A., YOSHIDA, C.S., MAZUCHELI, J., PERALTA, R.M., SVIDZINSKI, T.I.E. (2005). Correlation of *Candida* species and

symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil.

*Rev. Iberoam. Micol.*, 21: 202-205.

26. COSTA, S.F., MARINHO, I., ARAUJO, E.A., MANRIQUE, A.E., MEDEIROS, E.A.S. (2000). Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. *Journal of Hospital Infection* **45**: 69-72.
27. CHANG, H.C., CHANG, J.J., HUANG, A.H., CHANG, T.C. (2003). Evaluation of a Capacitance Method for Direct Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts in Positive Blood Cultures. *Journal of Clin. Microbiol.* **38** (3): 971-976.
28. CHANDRA, J., KUHN, D.M, MUKHERJEE, P.K., HOYER, L.L., MCCORMICK, T.,GHANNOUM, M.A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. *Journal of Bacteriology.* **183** (18): 5385-5394.
29. CHAFFIN, W.L., LÓPEZ-RIBOT, J.L., CASANOVA, M., GOZALBO, D., MARTINEZ, J.P. (1998). Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function and Expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **62** (1): 130-180.
30. CHEN, S.C., O'DONNELL, M.L., GORDON, S., GILBERT, G.L. (1996) Antifungal susceptibility testing using the E test: comparison with the broth macrodilution technique. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **37**: 265-273.

31. DE OLIVEIRA, R.D.R., MAFFEI, C.M.L., MARTINEZ, R. (2001). Infecção urinária hospitalar por leveduras do género *Candida*. *Rev. Ass. Med. Brasil.* **47** (3): 231-235.
32. DIEKEMA, D.J., PFALLER, M.A., JONES, R.N. (2002). Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America. *Journal of Clin. Microbiol.* **20**: 412-418.
33. ELLEPOLA, A.N.B., SAMARANAYKE, L.P. (1998). Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. *Archives of Oral Biology.* **43**: 999-1007.
34. EINSELE, H., HEBART, H., ROLLER, G., LÖFFLER, J., ROTHENHÖFER, I., MÜLLER, C.A. (1997). Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *Journal of Clin. Microbiol.* **35** (6): 1353-60.
35. FAVEL, A., MICHEL-NGUYEN, A., CHASTIN, C., TROUSSON, F., PENAUD, A., REGLI, P. (1997). In vitro susceptibility pattern of *Candida lusitanae* and evaluation of the Etest method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **39**: 591-596.
36. FINLAY, B.B., FALKOW, S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.* **53**: 210-30.

37. FRIDKIN, S.K., JARVIS, W.R. (1996). Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **9** (4):499-511.
38. GHANNOUM, M.A., RADWAN, S.S. (1990). *Candida* adherence to epithelial cells. New York: *CRC Press*.
39. GHANNOUM, M.A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 122-43.
40. GILFILLAN G.D., SULLIVAN D.J., HAYNES K., PARKINSON T., COLEMAN D.C., GOW N.A.R. (1998). *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology*. **144**: 829-838.
41. GODOY, P., TIRABOSCHI, I.N., SEVERO, L.C. BUSTAMANTE B, B. CALVO, B., DA MATTA, D.A. (2003) Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida spp.* bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Journal of Hospital Infection*. **98**: 401-405.
42. GOLDANY, L.Z., MARIO, P.S. (2003). *Candida tropicalis* fungemia in a therapy care hospital. *Journal of Hospital Infection*. **46**: 150-160.

43. GOLDANI, L.Z., SUGAR, A.M. (1998). Use of the Polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine Paracoccidioidomycosis. *J. Trop. Med. Hyg.* **58** (2): 152-153.
  
44. GEE S.F., JOLY S., SOLL D.R., MEIS J.F.G., VERWEIJ P.E., POLACHECK I., SULLIVAN D.J., COLEMAN D.C. (2002). Identification of Four Distinct Genotypes of *Candida dubliniensis* and Detection of Microevolution *In Vitro* and *In Vivo*. *Journal of Clin. Microbiol.* **40** (2): 556-574.
  
45. GROLL, A. H., PISCITELLI, S C AND WALSH, T J. (2004) Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. *Advances in Pharmacology.* **44**: 343-500.
  
46. HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY, T.V. (2000). *Maleleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ formation by *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **38**: 355-362.
  
47. HAZEN, K.C., WU, J.G., MASUOKA, J. (2001). Comparison of hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Infect. Immun.* **69**: 779-86.
  
48. HOSPENTHAL, D.R., BECKIUS, M.L., FLOYD, K.L., HORVATH, L.L., MURRAY, C.K. (2006). Presumptive identification of *Candida* species other than

*C.albicans*, *C.krusei* and *C. tropicalis* with the cromogenic medium CHROMagar Candida. *Journal of Microbiol.* **45**: 69-72.

49. IWEN, P.C., KELLY, D.M., REED, E.C., HINRICHS, S.H. (1995) Invasive infection due to *Candida krusei* in immunocompromised patients not treated with fluconazole. *Clinical Infectious Diseases* **20**: 342-347.
50. JARVIS, W.R. (1995). Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clin. Infect. Dis.* **20** (6): 1526-1530.
51. JONHSON, B.L., KAUFFMAN, C.A. (2003). Voriconazole a new triazole antifungal agent. *Clin. Infect. Dis.* 630-637.
52. KAPPE, R., MULLER, J. (1998). Rapid clearance of *Candida albicans* mannan antigens by liver and spleen in contrast to prolonged circulation of *Cryptococcus neoformans* antigens. *Journal of Microbiol.* **29**: 1665–1669.
53. KAPPE, R., SCHULZE-BERGE, A. (1993). New cause for false-positive results with the Pastorex *Aspergillus* antigen latex agglutination test. *Journal of Microbiol.* **31**: 2489–2490.
54. KARAHAN, Z.C., AKAR, N. (2005). Subtypes of genotype A *Candida albicans* isolates determined by restriction endonuclease and sequence analyses. *Microbiological Research.* **160**: 361-366.

55. KAUFFMAN, C.A., VAZQUEZ, J. A., SOBEL, J. D. (2000). Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. *Clin. Infect. Dis.* **30** (1): 14-18.
56. KEATING, G.M., JARVIS, B. (2001). Caspofungin. *Drugs* **61** (8): 1121-1129.
57. KILPATRICK, C.H. (1989). Chronic mucocutaneous candidiasis. *Journal of Clin. Microbiol.* **8**: 448-456.
58. KONEMAN, E. W. (1997). Diagnostic microbiology. 5th ed. *Philadelphia: Lippincott*. 1397.
59. KUHN, D.M, BALKIS M., CHANDRA, J., MUKHERJEE, P.K., GHANNOUM, M.A. (2003). Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *Journal of Clin. Microbiol.* **41** (1): 506-508.
60. KNOW, S., GIHUCHI, R. (1989). Avoiding false positive with PCR. *Nature* **339**: 237-238.
61. KNOW-CHUNG, K.J. & BENETT, J.E. (1992). Medical Micology. Lea & Febiger.
62. LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J. E. C., HEINS-VACCARI, E., MELO, N. T. (2002). Tratado de Micologia Médica – Lacaz. *São Paulo, SP Sarvier*. 123-173.

63. LENGELER, K.B., DAVIDSON, R.C., D'SOUSA, C., HARASHIMA, T., SHEN, W., WANG, P., WAUGH, M., HEITMAN, J. (2000). Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64** (4): 746-785.
64. LLANOS, R., ESPINAR, M.T., QUEROL, A. (2004). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Journal of Clin. Microbiol.* **85**: 175-185.
65. LEVY, I. (1998). Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia un children. *Clinical Infectious Diseases* **26**: 243-249.
66. MAHNSS, B., STEHR, F., SCHÄFER, W., NEUBER, K. (2005). Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*. **48** (1): 55-61.
67. MARR, K.A., SWANSON, H., HUGHES, P.A. (2000). Prolonged fluconazole prophylaxis in associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant recipients: long-term follow-up of a randomized, placebo-controlled trial. *Blood*. **96**: 2055-61.
68. McCULLOUGH, M., ROSS, B., READE, P. (1995). Characterization of Genetically Distinct Subgroup of *Candida albicans* Stains Isolated from Oral Cavities of



Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Clin. Microbiol.* **33**: 696-700.

69. MERZ W.G., BECK-SAGUÉ, M. C., JARVIS, W. R. (1994). Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clinical Infectious Diseases* **167** (5): 124
70. MEHTA, S.K., STEVENS, D. A., MISHRA, S. K., FEROZE, F., PIERSON, D.L. (1999). Distribution of *Candida albicans* genotypes among family members. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **34** (1): 19-25.
71. MIDGLEY, G., CLAYTON, Y. M., RODERICK, J. H. (1998). Micologia médica. *São Paulo: Manole.* 155.
72. MIRHENDI, H., MAKIMURA, K., KHORAMIZADEH, M., YAMAGUCHI, H. (2006). A one enzyme PCR-RFLP assay for Identification of six Medically Important Candida Species. *Journal of Clin. Microbiol.* **47**: 225-229.
73. MIRHENDI, H., MAKIMURA, K., KHORAMIZADEH, M., YAMAGUCHI, H. (2005). Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Using a Single-Enzyme PCR-RFLP Method. *Journal of Clin. Microbiol.* **58**: 235-237.

74. MOTOYAMA, A.B., VENANCIO, E.J., BRANDÃO, G.O. (2000). Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. *Journal of Clin. Microbiol.* **38** (8): 3406- 3109.
75. MOUSSAVI, S.A., KHALESİ, E., BONJAR, S., AGHIGHİ, S., SHARIFI, F., ARAM, F. (2007). Rapid Molecular Diagnosis for *Candida* species using PCR-RFLP. *Journal of Clin. Microbiol.* **64**: 583-587.
76. MORACE, G., SANGUINETTI, M., POSTERARO, B., CASCIO, G. L., FADDA, G. (1997). Identification of various medically important *Candida* species by PCR-restriction enzyme analysis. *Journal of Clin. Microbiol.* **35** (3): 667-672.
77. MOREIRA, A., FALCÃO, A., ANDRADE, A., SOUZA, E. (2002). Isolation of *Candida parapsilosis* in a patient with clinic diagnosis of chronic atrophic candidiasis. *Microbiological Research.* **23**: 124-128.
78. MOSAID, A., SULLIVAN, D.J., SALKIN, I., SHANLEY, D., COLEMAN, D.C. (2001). Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib Agar and Caffeic Acid-Ferric Citrate Agar. *Journal of Clin. Microbiol.* **39** (1): 323-327.
79. NUCCI, M, COLOMBO, A.L. (2002). Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. *Brazil J. Infect. Dis.* **6** (3): 124-28.

80. O'SULLIVAN, J.M., JENKINSON, H.F., CANNON, R.D. (2000) Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal. *Microbiology*. **146**: 41-48.
81. PFALLER, M.A. (1994). Epidemiology and control of fungal infections. *Clinical Infectious Diseases* **19**: 8-13.
82. PFALLER, M.A. (1996). Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clinical Infectious Diseases* **22**: 89-94.
83. PFALLER, M.A., HOUSTON, A., COFFMANN, S. (1996). Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Journal of Clin. Microbiol.* **34**: 58-61.
84. PFALLER, M. A., JONES, R. N., DOERN, G. V. (1998). International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY program. *Journal of Clin. Microbiol.* **36** (7): 1886-1889.
85. PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J. (2002). Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. *Journal of Clin. Microbiol.* **40** (10): 3551- 3557.

86. REX, J.H., BENNETT, J.E., SUGAR, A.M. (1994). A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia of patients without neutropenia. *N. Engl. J. Med.* **331** (20): 1325-1330.
87. REISS, E., ODDS, O. (1998). Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med. Mycol.* **36**: 249-57.
88. RHO, J., SHIN, J. H., ONG, J. W. (2004). Molecular investigation of two consecutive nosocomial clusters of *Candida tropicalis* candiduria using pulse-field gel electrophoresis. *Journal of Clin. Microbiol.* **42** (2): 80-86.
89. RICHARDSON, M.D., WARNOCK, D.W. (1992). Fungal Infection. Diagnosis and Management. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
90. SAFRAN, D. B., HAWSER, S.P., DOUGLAS, L.J. (1995) Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **39** (9): 2128-2131.
91. SANGLLARD, D., TRICK, W.E., SCHONIAN, G., MEYER, W. (2002). Secular trends of candidemia in a large tertiary-care hospital from 1988 to 2000: emergence of *Candida parapsilosis*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **26** (6): 548-55.

92. SANDHU, G.S., ALEFF, R.A., KLINE, B.C. (1997). Molecular detections and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clin. Microbiol.* **35**: 1894-1896.
93. SELITRENNIKOFF, C.P. (2001). Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology.* **67** (7): 2883-2894.
94. SHEEDAN, D.J., SPELBERG BJ, FILLER SG, EDWARDS JR JE. (1999). Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clinical Infectious Diseases.* **2**: 244-251.
95. SILVA, V.V., DÍAZ, M.C., FEBRÉ, N. (2002). Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev. Chi. Infec.* **19** :56-65.
96. SHIN, J.H., SOBEL, J.D. (2002). Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *Journal of Clin. Microbiol.* **40**: 1244-56.
97. SULLIVAN, D.J., WESTERNENG, T.J., HAYNES, K.A., BENNETT, D.E., AND COLEMAN, D.C. (1995). *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidiasis in HIV-infected individuals. *Journal of Clin. Microbiol.* **141**: 1507-1521.

98. TAYLOR, B.N.; HARRER, T.; PSCHIEDL, E. (2003). Surveillance of nosocomial transmission of *Candida albicans* in an intensive care unit by DNA fingerprinting. *Journal of Hospital Infection*. **55** (4): 283-289.
99. TRICK, W.E., SCHONIAN, G., MEYER, W. (2002). Secular trend of Hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clinical Infectious Diseases*. **3** (5): 627-630.
100. TROST, A., GRAF, B., EUCKER, J., SEZER, O., POSSINGER, K. TOMAS, A. (2004). Identification of Clinically relevant yeast by PCR/RFLP. *Journal of Clin. Microbiol.* **56**: 201-211.
101. VAZQUEZ, J.A., SANCHEZ, V., DMUCHOWSKI, C. (1993). Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiology study. *Clinical Infectious Diseases*. **168** (1): 195-201.
102. VELEGRAKI, A., KAMBOURIS, E., SKINITOTIS, G., SAVALA, M., LAGAKIS, J.N. (1999). Identification of medically significant fungal genera by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme analysis. *Microbiological Research*. **23**: 303-312.
103. VOSS A., VERWEIJ, P.E.; BREUKER, I. M.; RIJS, A. J.; MEIS, J. F. (1996). Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *J. Clin. Pathol.* **52** (4) 271-273.

104. VOSS A., LUNEL F.M.V., MEIS J.F.G.M., (2000). Nosocomial fungal infections: candidemia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **34**: 213-220.
105. WAHYUNINGSIH, R., FREISLEBEN, H. J., SONNTAG, H. G., SCHNITZLER, P. (2000). Simple and Rapid Detection of *Candida albicans* DNA in Serum by PCR for Diagnosis of Invasive Candidiasis. *Journal of Clin. Microbiol.* **38** (8): 3016-3021.
106. WINGARD, J.R. (1996). Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin. Infect. Dis.* **20** (1): 115-125
107. WHITE, T.C., MARR, K.A., BOWDEN, R.A. (1998) Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* **11** (2): 382-402.
108. YANG, C.W., BARKHAM, T.M.S., CHAN, F.Y., WANG, Y. (2003). Prevalence of *Candida* Species, Including *Candida dubliniensis*, in Singapore. *Journal of Clin. Microbiol.* **41** (1): 472-474.
109. ZAOUTIS, T. E., ARGON, J., CHU, J., BERLIN, J. A., WALSH, T. J., FEUDTNER, C. (2005). The Epidemiology and Attributable Outcomes of Candidemia in Adults and Children Hospitalized in the United States: A Propensity Analysis. *Clin. Infect. Dis.* **41** (9) 1232-1239.





Tabela 24: Identificação convencional das leveduras isoladas no Centro Hospitalar da Cova da Beira

E.P.E. a partir de doentes com infecção fúngica.

Nº de identificação	Idade	Produto biológico	Espécie	Teste da Blastese	Bichro latex	Meio Cromogénico	Vitek
947/08	94	Expectoração	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
948/08	82	Expectoração	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
949/08	85	Expectoração	<i>C. tropicalis</i>	-		Colónias azuis	<i>C. tropicalis</i>
950/08	53	Expectoração	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
951/08	34	Exs. Vaginal	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
952/08	61	Expectoração	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
953/08	85	L. Ascítico	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
954/08	80	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
955/08	7	Exs.gastrostomia	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
956/08	65	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
07/09	71	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
08/09	61	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
09/09	30	Es x. Vaginal	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
10/09	40	Es x. Vaginal	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
11/09	87	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
12/09	87	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
13/09	87	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
14/09	94	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
15/09	90	Urina	<i>C. glabrata</i>	-		Colónias de outra cor	<i>C. glabrata</i>
16/09	80	Cateter	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
17/09	80	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>

Nº de identificação	Idade	Produto biológico	Esécie	Teste da Blastese	Bichro latex	Meio Cromogéneo	Vitek
31/09	80	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
32/09	80	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
33/09	80	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
34/09	82	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
35/09	80	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
36/09	65	Cateter	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
37/09	21	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
38/09	80	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
39/09	80	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
40/09	75	Asp. Brônquico	<b><i>C. glabrata</i></b>	-		Colónias de outra cor	<b><i>C. glabrata</i></b>
41/09	75	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
42/09	88	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
43/09	84	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
76/09	86	Exsudado	<i>C. albicans</i>	-	+	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
77/09	20	Exs. Vaginal	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
78/09	86	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
79/09	86	Urina	<b><i>C. tropicalis</i></b>	-		Colónias azuis	<b><i>C. tropicalis</i></b>
80/09	57	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
81/09	91	Expectoração	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
82/09	81	Asp. Brônquico	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
83/09	86	Expectoração	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
84/09	86	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
85/09	86	Hemocultura	<b><i>C. glabrata</i></b>	-		Colónias de outra cor	<b><i>C. glabrata</i></b>
86/09	76	Expectoração	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>

Nº de identificação	Idade	Produto biológico	Espécie	Teste da Blastese	Bichro latex	Meio Cromogénico	Vitek
87/09	86	Cateter	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
89/09	72	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
108/09	66	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
109/09	65	Fezes	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
110/09	77	Expectoração	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
111/09	88	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
112/09	87	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
113/09	33	Exsudado	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
114/09	33	Exsudado	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
115/09	90	Expectoração	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
116/09	75	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
117/09	48	Exs. Vaginal	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
118/09	65	Asp. Brônquico	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
119/09	86	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
120/09	65	Asp. Brônquico	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
121/09	66	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
122/09	65	Asp. Brônquico	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
123/09	19	Pús	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
124/09	79	Liq. Ascítico	<i>C. krusei</i>	-		Colónias rosa	<i>C. krusei</i>
125/09	79	Liq. Ascítico	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
126/09	38	Exs. Vaginal	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
127/09	79	Liq. Peritoneal	<i>C. krusei</i>	-		Colónias rosa	<i>C. krusei</i>
143/09	75	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
144/09	51	Pús	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>

Nº de identificação	Idade	Produto biológico	Espécie	Teste da Blastese	Bichro latex	Meio Cromogénico	Vitek
145/09	51	Liq. Biológico	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
146/09	75	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
147/09	65	Liq. Pleural	<i>C. lusitaniae</i>	-		Colónias de outra cor	<i>C. lusitaniae</i>
148/09	65	Exsudado	<i>C. lusitaniae</i>	-		Colónias de outra cor	<i>C. lusitaniae</i>
149/09	78	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
150/09	78	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
151/09	86	Urina	<i>C. glabrata</i>	-		Colónias de outra cor	<i>C. glabrata</i>
152/09	85	Urina	<i>C. glabrata</i>	-		Colónias de outra cor	<i>C. glabrata</i>
153/09	78	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
154/09	83	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
167/09	87	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
168/09	65	Abcesso Torácico	<i>C. lusitaniae</i>	-		Colónias de outra cor	<i>C. lusitaniae</i>
169/09	90	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
170/09	45	Exs. Vaginal	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
171/09	68	Asp. Brônquico	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
190/09	56	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
191/09	85	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
192/09	85	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
193/09	37	Exs. Vaginal	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
194/09	77	Expectoração	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
195/09	88	Pús	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
196/09	59	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
197/09	87	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
212/09	77	Urina	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>

Nº de identificação	Idade	Produto biológico	Espécie	Teste da Blastese	Bichro latex	Meio Cromogénico	Vitek
213/09	40	Exs. Vaginal	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
214/09	89	Urina	<i>C. lusitaniae</i>	-		Colónias de outra cor	<i>C. lusitaniae</i>
215/09	65	Expectoração	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
216/09	38	Expectoração	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
217/09	65	Expectoração	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
218/09	81	Expectoração	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>
219/09	43	Expectoração	<i>C. albicans</i>	+		Colónias verdes	<i>C. albicans</i>



**Tabela 25:** Resultados do estudo da sensibilidade aos antifúngicos fluconazol e voriconazol pelo método de difusão em disco das leveduras do Centro Hospitalar da Cova da Beira E.P.E. incluídas neste trabalho.

		Fluconazol			Voriconazol		
Nº de identificação	Es pécie	Diâmetro do halo	S/R	MIC	Diâmetro do halo	S/R	MIC
947/08	<i>C. albicans</i>	7	Resistente	>165	9	Resistente	4.9
948/08	<i>C. albicans</i>	33	Sensível	0.68	37	Sensível	<0.01
949/08	<i>C. tropicalis</i>	36	Sensível	0.32	28	Sensível	0.1
950/08	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	0.25	40	Sensível	0.01
951/08	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	<0.25	32	Sensível	0.04
952/08	<i>C. albicans</i>	26	Sensível	3.9	30	Sensível	0.06
953/08	<i>C. albicans</i>	35	Sensível	0.41	39	Sensível	<0.01
954/08	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	<0.25	37	Sensível	<0.01
955/08	<i>C. albicans</i>	36	Sensível	0.32	37	Sensível	<0.01
956/08	<i>C. albicans</i>	40	Sensível	<0.25	44	Sensível	<0.01
07/09	<i>C. albicans</i>	34	Sensível	0.53	38	Sensível	<0.01
08/09	<i>C. albicans</i>	41	Sensível	0.25	43	Sensível	<0.01
09/09	<i>C. albicans</i>	34	Sensível	0.53	36	Sensível	0.02
10/09	<i>C. albicans</i>	39	Sensível	<0.25	39	Sensível	<0.01
11/09	<i>C. albicans</i>	38	Sensível	<0.25	45	Sensível	<0.01
12/09	<i>C. albicans</i>	36	Sensível	0.32	39	Sensível	<0.01
13/09	<i>C. albicans</i>	40	Sensível	<0.25	42	Sensível	<0.01
14/09	<i>C. albicans</i>	41	Sensível	<0.25	50	Sensível	<0.01
15/09	<i>C. glabrata</i>	26	Sensível	3.9	37	Sensível	<0.01
16/09	<i>C. albicans</i>	47	Sensível	<0.25	42	Sensível	<0.01
17/09	<i>C. albicans</i>	46	Sensível	<0.25	55	Sensível	<0.01

		Fluconazol			Voriconazol		
Nº de identificação	Esécie	Diâmetro do halo	S/R	MIC	Diâmetro do halo	S/R	MIC
31/09	<i>C. albicans</i>	32	Sensível	0.87	40	Sensível	<0.01
32/09	<i>C. albicans</i>	34	Sensível	0.53	37	Sensível	<0.01
33/09	<i>C. albicans</i>	36	Sensível	0.32	36	Sensível	0.02
34/09	<i>C. albicans</i>	35	Sensível	0.41	37	Sensível	<0.01
35/09	<i>C. albicans</i>	33	Sensível	0.68	38	Sensível	<0.01
36/09	<i>C. albicans</i>	34	Sensível	0.53	37	Sensível	<0.01
37/09	<i>C. albicans</i>	35	Sensível	0.41	37	Sensível	<0.01
38/09	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	<0.25	39	Sensível	<0.01
39/09	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	<0.25	39	Sensível	<0.01
40/09	<i>C. glabrata</i>	15	<b>SDD</b>	61	31	Sensível	0.05
41/09	<i>C. albicans</i>	36	Sensível	0.32	32	Sensível	0.04
42/09	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	<0.25	36	Sensível	0.02
43/09	<i>C. albicans</i>	34	Sensível	0.53	37	Sensível	<0.01
76/09	<i>C. albicans</i>	36	Sensível	0.32	36	Sensível	0.02
77/09	<i>C. albicans</i>	34	Sensível	0.53	36	Sensível	0.02
78/09	<i>C. albicans</i>	39	Sensível	<0.25	39	Sensível	<0.01
79/09	<i>C. tropicalis</i>	38	Sensível	<0.25	45	Sensível	<0.01
80/09	<i>C. albicans</i>	36	Sensível	0.32	39	Sensível	<0.01
81/09	<i>C. albicans</i>	34	Sensível	0.53	36	Sensível	0.02
82/09	<i>C. albicans</i>	39	Sensível	<0.25	39	Sensível	<0.01
83/09	<i>C. albicans</i>	38	Sensível	<0.25	45	Sensível	<0.01
84/09	<i>C. albicans</i>	36	Sensível	0.32	32	Sensível	0.04
85/09	<i>C. glabrata</i>	26	Sensível	3.9	37	Sensível	<0.01
86/09	<i>C. albicans</i>	36	Sensível	0.32	32	Sensível	0.04



		Fluconazol			Voriconazol		
Nº de identificação	Esécie	Diâmetro do halo	S/R	MIC	Diâmetro do halo	S/R	MIC
87/09	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	<0.25	36	Sensível	0.02
89/09	<i>C. albicans</i>	34	Sensível	0.53	37	Sensível	<0.01
108/09	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	<0.25	35	Sensível	0.02
109/09	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	<0.25	6	<b>Resistente</b>	>6.1
110/09	<i>C. albicans</i>	43	Sensível	<0.25	40	Sensível	<0.01
111/09	<i>C. albicans</i>	39	Sensível	<0.25	43	Sensível	<0.01
112/09	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	<0.25	42	Sensível	<0.01
113/09	<i>C. albicans</i>	34	Sensível	0.53	36	Sensível	0.02
114/09	<i>C. albicans</i>	34	Sensível	0.53	31	Sensível	<0.01
115/09	<i>C. albicans</i>	41	Sensível	<0.25	40	Sensível	<0.01
116/09	<i>C. albicans</i>	43	Sensível	<0.25	45	Sensível	<0.01
117/09	<i>C. albicans</i>	36	Sensível	0.32	42	Sensível	<0.01
118/09	<i>C. albicans</i>	42	Sensível	<0.25	37	Sensível	<0.01
119/09	<i>C. albicans</i>	42	Sensível	<0.25	47	Sensível	<0.01
120/09	<i>C. albicans</i>	15	<b>SDD</b>	61	26	Sensível	0.15
121/09	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	<0.25	40	Sensível	<0.01
122/09	<i>C. albicans</i>	38	Sensível	<0.25	48	Sensível	<0.01
123/09	<i>C. albicans</i>	36	Sensível	0.32	42	Sensível	<0.01
124/09	<i>C. krusei</i>	17	<b>SDD</b>	37	31	Sensível	0.05
125/09	<i>C. albicans</i>	43	Sensível	<0.25	44	Sensível	<0.01
126/09	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	<0.25	47	Sensível	<0.01
127/09	<i>C. krusei</i>	15	<b>SDD</b>	61	25	Sensível	0.18
143/09	<i>C. albicans</i>	39	Sensível	<0.25	41	Sensível	<0.01
144/09	<i>C. albicans</i>	46	Sensível	<0.25	42	Sensível	<0.01

		Fluconazol			Voriconazol		
Nº de identificação	Esécie	Diâmetro do halo	S/R	MIC	Diâmetro do halo	S/R	MIC
145/09	<i>C. albicans</i>	38	Sensível	<0.25	42	Sensível	<0.01
146/09	<i>C. albicans</i>	46	Sensível	<0.25	42	Sensível	<0.01
147/09	<i>C. lusitanea</i>	60	Sensível	<0.25	56	Sensível	<0.01
148/09	<i>C. lusitanea</i>	54	Sensível	<0.25	54	Sensível	<0.01
149/09	<i>C. albicans</i>	43	Sensível	<0.25	44	Sensível	<0.01
150/09	<i>C. albicans</i>	42	Sensível	<0.25	45	Sensível	<0.01
151/09	<i>C. glabrata</i>	40	Sensível	<0.25	47	Sensível	<0.01
152/09	<i>C. glabrata</i>	26	Sensível	3.9	38	Sensível	<0.01
153/09	<i>C. albicans</i>	40	Sensível	<0.25	54	Sensível	<0.01
154/09	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	<0.25	40	Sensível	<0.01
167/09	<i>C. albicans</i>	38	Sensível	<0.25	47	Sensível	<0.01
168/09	<i>C. lusitanea</i>	48	Sensível	<0.25	50	Sensível	<0.01
169/09	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	<0.25	42	Sensível	<0.01
170/09	<i>C. albicans</i>	40	Sensível	<0.25	45	Sensível	<0.01
171/09	<i>C. albicans</i>	44	Sensível	<0.25	45	Sensível	<0.01
190/09	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	<0.25	44	Sensível	<0.01
191/09	<i>C. albicans</i>	32	Sensível	0.87	37	Sensível	<0.01
192/09	<i>C. albicans</i>	35	Sensível	0.41	47	Sensível	<0.01
193/09	<i>C. albicans</i>	32	Sensível	0.87	35	Sensível	0.02
194/09	<i>C. albicans</i>	56	Sensível	<0.25	41	Sensível	<0.01
195/09	<i>C. albicans</i>	39	Sensível	<0.25	39	Sensível	<0.01
196/09	<i>C. albicans</i>	37	Sensível	<0.25	40	Sensível	<0.01
197/09	<i>C. albicans</i>	41	Sensível	<0.25	42	Sensível	<0.01
212/09	<i>C. albicans</i>	34	Sensível	0.53	38	Sensível	<0.01

		Fluconazol			Voriconazol		
Nº de identificação	Espécie	Diâmetro do halo	S/R	MIC	Diâmetro do halo	S/R	MIC
213/09	<i>C. albicans</i>	41	Sensível	0.25	43	Sensível	<0.01
214/09	<i>C. lusitanea</i>	34	Sensível	0.53	36	Sensível	0.02
215/09	<i>C. albicans</i>	39	Sensível	<0.25	39	Sensível	<0.01
216/09	<i>C. albicans</i>	38	Sensível	<0.25	45	Sensível	<0.01
217/09	<i>C. albicans</i>	36	Sensível	0.32	39	Sensível	<0.01
218/09	<i>C. albicans</i>	40	Sensível	<0.25	42	Sensível	<0.01
219/09	<i>C. albicans</i>	41	Sensível	<0.25	50	Sensível	<0.01



**Tabela 26:** Resultados da identificação convencional e molecular dos isolados de leveduras do género *Candida* incluídas neste trabalho, isoladas no Centro Hospitalar da Cova da Beira E.P.E.

Nº de identificação	Idade	Produto biológico	Identificação por métodos tradicionais	Identificação PCR-RFLP <i>MspI</i>
947/08	94	Expectoração	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
948/08	82	Expectoração	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
949/08	85	Expectoração	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
950/08	53	Expectoração	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
951/08	34	Exs. Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
952/08	61	Expectoração	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
953/08	85	L. Ascítico	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
954/08	80	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
955/08	7	Exs.gastrotomia	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
956/08	65	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
07/09	71	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
08/09	61	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
09/09	30	Es x. Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
10/09	40	Es x. Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
11/09	87	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
12/09	87	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
13/09	87	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
14/09	94	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
15/09	90	Urina	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
16/09	80	Cateter	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
17/09	80	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
31/09	80	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>

Nº de identificação	Idade	Produto biológico	Identificação por métodos tradicionais	Identificação PCR-RFLP <i>MspI</i>
32/09	80	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
33/09	80	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
34/09	82	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
35/09	80	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
36/09	65	Cateter	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
37/09	21	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
38/09	80	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
39/09	80	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
40/09	75	Asp. Brônquico	<b><i>C. glabrata</i></b>	<b><i>C. glabrata</i></b>
41/09	75	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
42/09	88	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
43/09	84	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
76/09	86	Exsudado	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
77/09	20	Exs. Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
78/09	86	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
79/09	86	Urina	<b><i>C. tropicalis</i></b>	<b><i>C. tropicalis</i></b>
80/09	57	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
81/09	91	Expectoração	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
82/09	81	Asp. Brônquico	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
83/09	86	Expectoração	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
84/09	86	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
85/09	86	Hemocultura	<b><i>C. glabrata</i></b>	<b><i>C. glabrata</i></b>
86/09	76	Expectoração	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
87/09	86	Cateter	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
89/09	72	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>

Nº de identificação	Idade	Produto biológico	Identificação por métodos tradicionais	Identificação PCR-RFLP <i>MspI</i>
108/09	66	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
109/09	65	Fezes	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
110/09	77	Expectoração	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
111/09	88	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
112/09	87	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
113/09	33	Exsudado	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
114/09	33	Exsudado	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
115/09	90	Expectoração	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
116/09	75	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
117/09	48	Exs. Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
118/09	65	Asp. Brônquico	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
119/09	86	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
120/09	65	Asp. Brônquico	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
121/09	66	Hemocultura	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
122/09	65	Asp. Brônquico	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
123/09	19	Pús	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
124/09	79	Liq. Ascítico	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
125/09	79	Liq. Ascítico	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
126/09	38	Exs. Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
127/09	79	Liq. Peritoneal	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
143/09	75	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
144/09	51	Pús	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
145/09	51	Liq. Biológico	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
146/09	75	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
147/09	65	Liq. Pleural	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>

Nº de identificação	Idade	Produto biológico	Identificação por métodos tradicionais	Identificação PCR-RFLP <i>MspI</i>
148/09	65	Exsudado	<i>C. lusitanea</i>	<i>C. lusitanea</i>
149/09	78	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
150/09	78	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
151/09	86	Urina	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
152/09	85	Urina	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
153/09	78	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
154/09	83	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
167/09	87	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
168/09	65	Abcesso Torácico	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>
169/09	90	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
170/09	45	Exs. Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
171/09	68	Asp. Brônquico	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
190/09	56	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
191/09	85	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
192/09	85	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
193/09	37	Exs. Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
194/09	77	Expectoração	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
195/09	88	Pús	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
196/09	59	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
197/09	87	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
212/09	77	Urina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
213/09	40	Exs. Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
214/09	89	Urina	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>
215/09	65	Expectoração	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
216/09	38	Expectoração	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>



<b>Nº de identificação</b>	<b>Idade</b>	<b>Produto biológico</b>	<b>Identificação por métodos tradicionais</b>	<b>Identificação PCR-RFLP <i>MspI</i></b>
<b>217/09</b>	65	Expectoração	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
<b>218/09</b>	81	Expectoração	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
<b>219/09</b>	43	Expectoração	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>



**Tabela 27:** Identificação dos diferentes produtos biológicos de acordo com o sexo, idade, serviço clínico do Centro Hospitalar da Cova da Beira E.P.E. que solicitou o diagnóstico laboratorial e enviou as amostras biológicas para análise e identificação do isolado.

Nº de identificação	Sexo	Idade	Produto biológico	Serviço clínico	Es pécie
947/08	F	94	Expectoração	Pneumologia	<i>C. albicans</i>
948/08	M	82	Expectoração	U.C.I	<i>C. albicans</i>
949/08	M	85	Expectoração	U.C.I	<b><i>C. tropicalis</i></b>
950/08	M	53	Expectoração	U.C.I	<i>C. albicans</i>
951/08	F	34	Exs. Vag inal	Medicina II	<i>C. albicans</i>
952/08	M	61	Expectoração	Medicina I	<i>C. albicans</i>
953/08	M	85	L. Ascítico	Cirurg ia Homens	<i>C. albicans</i>
954/08	F	80	Urina	Medicina II	<i>C. albicans</i>
955/08	M	7	Exs.gastrostomia	Pediatria	<i>C. albicans</i>
956/08	F	65	Urina	Ortopedia	<i>C. albicans</i>
07/09	M	71	Urina	Urgência	<i>C. albicans</i>
08/09	M	61	Urina	Cirurg ia Homens	<i>C. albicans</i>
09/09	F	30	Es x. Vag inal	Centro de Saúde	<i>C. albicans</i>
10/09	F	40	Es x. Vag inal	Ginecologia	<i>C. albicans</i>
11/09	F	87	Urina	U.C.I	<i>C. albicans</i>
12/09	F	87	Hemocultura	U.C.I	<i>C. albicans</i>
13/09	F	87	Urina	U.C.I	<i>C. albicans</i>
14/09	M	94	Urina	Medicina II	<i>C. albicans</i>
15/09	F	90	Urina	Ortopedia	<b><i>C. glabrata</i></b>

Nº de identificação	Sexo	Idade	Produto biológico	Serviço clínico	Es pécie
16/09	F	80	Cateter	Cirurg ia Mulheres	<i>C. albicans</i>
17/09	F	80	Hemocultura	Cirurg ia Mulheres	<i>C. albicans</i>
31/09	F	80	Urina	Medicina Mulheres	<i>C. albicans</i>
32/09	F	80	Hemocultura	U.C.I	<i>C. albicans</i>
33/09	F	80	Urina	U.C.I	<i>C. albicans</i>
34/09	F	82	Urina	Medicina II	<i>C. albicans</i>
35/09	F	80	Hemocultura	Cirurg ia Mulheres	<i>C. albicans</i>
36/09	M	65	Cateter	U.C.I	<i>C. albicans</i>
37/09	F	21	Urina	Urgência	<i>C. albicans</i>
38/09	F	80	Hemocultura	U.C.I	<i>C. albicans</i>
39/09	F	80	Urina	U.C.I	<i>C. albicans</i>
40/09	F	75	Asp. Brônquico	U.C.I	<b><i>C. glabrata</i></b>
41/09	F	75	Hemocultura	U.C.I	<i>C. albicans</i>
42/09	F	88	Urina	Urgência	<i>C. albicans</i>
43/09	F	84	Urina	Medicina I	<i>C. albicans</i>
76/09	M	86	Exsudado	Medicina I	<i>C. albicans</i>
77/09	F	20	Exs. Vag inal	Ginecologia	<i>C. albicans</i>
78/09	M	86	Urina	U.C.I	<i>C. albicans</i>
79/09	M	86	Urina	Cirurg ia Ho mens	<b><i>C. tropicalis</i></b>
80/09	F	57	Urina	Ginecologia	<i>C. albicans</i>
81/09	M	91	Expectoração	Medicina Ho mens	<i>C. albicans</i>
82/09	F	81	Asp. Brônquico	U.C.I	<i>C. albicans</i>
83/09	M	86	Expectoração	U.C.I	<i>C. albicans</i>

Nº de identificação	Sexo	Idade	Produto biológico	Serviço clínico	Esécie
84/09	M	86	Hemocultura	U.C.I	<i>C. albicans</i>
85/09	M	86	Hemocultura	U.C.I	<b><i>C. glabrata</i></b>
86/09	M	76	Expectoração	Medicina II	<i>C. albicans</i>
87/09	M	86	Cateter	U.C.I	<i>C. albicans</i>
89/09	F	72	Urina	Medicina II	<i>C. albicans</i>
108/09	M	66	Urina	Medicina I	<i>C. albicans</i>
109/09	F	65	Fezes	Medicina I	<i>C. albicans</i>
110/09	M	77	Expectoração	Medicina II	<i>C. albicans</i>
111/09	F	88	Urina	Neurologia	<i>C. albicans</i>
112/09	F	87	Urina	Medicina I	<i>C. albicans</i>
113/09	M	33	Exsudado	Medicina I	<i>C. albicans</i>
114/09	M	33	Exsudado	Medicina I	<i>C. albicans</i>
115/09	F	90	Expectoração	Medicina II	<i>C. albicans</i>
116/09	F	75	Urina	Cardiologia	<i>C. albicans</i>
117/09	F	48	Exs. Vaginal	Centro de Saúde	<i>C. albicans</i>
118/09	F	65	Asp. Brônquico	U.C.I	<i>C. albicans</i>
119/09	F	86	Urina	U.C.I	<i>C. albicans</i>
120/09	F	65	Asp. Brônquico	U.C.I	<i>C. albicans</i>
121/09	F	66	Hemocultura	Medicina II	<i>C. albicans</i>
122/09	F	65	Asp. Brônquico	U.C.I	<i>C. albicans</i>
123/09	M	19	Pús	Reumatologia	<i>C. albicans</i>
124/09	M	79	Liq. Ascítico	Gastroenterologia	<b><i>C. krusei</i></b>
125/09	M	79	Liq. Ascítico	Gastroenterologia	<i>C. albicans</i>

Nº de identificação	Sexo	Idade	Produto biológico	Serviço clínico	Es pécie
126/09	F	38	Exs. Vaginal	Ginecologia	<i>C. albicans</i>
127/09	M	79	Liq. Peritoneal	U.C.I	<i>C. krusei</i>
143/09	M	75	Urina	Medicina II	<i>C. albicans</i>
144/09	M	51	Pús	Cirurg ia Homens	<i>C. albicans</i>
145/09	M	51	Liq. Biológico	Cirurg ia Homens	<i>C. albicans</i>
146/09	M	75	Urina	Medicina II	<i>C. albicans</i>
147/09	F	65	Liq. Pleural	U.C.I	<i>C. lusitaniae</i>
148/09	F	65	Exsudado	U.C.I	<i>C. lusitaniae</i>
149/09	M	78	Urina	Medicina I	<i>C. albicans</i>
150/09	M	78	Urina	Medicina I	<i>C. albicans</i>
151/09	F	86	Urina	Medicina II	<i>C. glabrata</i>
152/09	F	85	Urina	Medicina I	<i>C. glabrata</i>
153/09	M	78	Urina	Medicina I	<i>C. albicans</i>
154/09	F	83	Urina	Medicina II	<i>C. albicans</i>
167/09	M	87	Urina	U.C.I	<i>C. albicans</i>
168/09	F	65	Abcesso Torácico	U.C.I	<i>C. lusitaniae</i>
169/09	M	90	Urina	Medicina I	<i>C. albicans</i>
170/09	F	45	Exs. Vaginal	Ginecologia	<i>C. albicans</i>
171/09	M	68	Asp. Brônquico	U.C.I	<i>C. albicans</i>
190/09	M	56	Urina	U.C.I	<i>C. albicans</i>
191/09	M	85	Urina	Medicina II	<i>C. albicans</i>
192/09	M	85	Urina	Medicina II	<i>C. albicans</i>
193/09	F	37	Exs. Vaginal	Centro de Saúde	<i>C. albicans</i>

<b>Nº de identificação</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Produto biológico</b>	<b>Serviço clínico</b>	<b>Es pécie</b>
<b>194/09</b>	M	77	Expectoração	Pneumologia	<i>C. albicans</i>
<b>195/09</b>	F	88	Pús	Urgência	<i>C. albicans</i>
<b>196/09</b>	F	59	Urina	Cirurgia Mulheres	<i>C. albicans</i>
<b>197/09</b>	M	87	Urina	Pneumologia	<i>C. albicans</i>
<b>212/09</b>	M	77	Urina	Medicina I	<i>C. albicans</i>
<b>213/09</b>	F	40	Exs. Vaginal	Centro de Saúde	<i>C. albicans</i>
<b>214/09</b>	F	89	Urina	Medicina II	<i>C. lusitaniae</i>
<b>215/09</b>	M	65	Expectoração	Medicina	<i>C. albicans</i>
<b>216/09</b>	F	38	Expectoração	Medicina II	<i>C. albicans</i>
<b>217/09</b>	M	65	Expectoração	Medicina II	<i>C. albicans</i>
<b>218/09</b>	M	81	Expectoração	Pneumologia	<i>C. albicans</i>
<b>219/09</b>	F	43	Expectoração	Centro de Saúde	<i>C. albicans</i>

U.C.I – Unidade de Cuidados Intensivos





## Meio De Cultura

### *Sabouraud + Cloranfenicol*

O meio de cultura Sabouraud com Cloranfenicol é o meio utilizado com mais frequência para o crescimento de espécies do género *Candida*. Este meio pode ser utilizado como meio de cultura líquido ou sólido, sendo preparado com uma concentração de dextrose 40 g/L. A preparação de meio sólido é feita com adição de 20g de Bacto agar, 10g de Peptona e 0,5g de Cloranfenicol.

Os meios foram esterilizados a 121°C durante 15 minutos e armazenados a uma temperatura entre 2-5°C.

## Soluções para PCR

### *Tampão TBE 10x*

Tris	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA 0,5M (pH 8)	100 ml
Água bidestilada	q.b. para 1 litro

### *Solução de Aplicação das Amostras no Gel de Agarose (Tampão de arrastamento)*

Glicerol	30% (p/v)
Azul de bromofenol	0,25%
EDTA	2 mM

